

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**EFFECTO DE PIOGLITAZONA Y ROSIGLITAZONA SOBRE
LAS FORMAS MOLECULARES DE ADIPONECTINA Y
SUS RECEPTORES.**

TESIS DOCTORAL

JIMENA PITA SANTIBÁÑEZ
MADRID, 2010

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**EFFECTO DE PIOGLITAZONA Y ROSIGLITAZONA SOBRE
LAS FORMAS MOLECULARES DE ADIPONECTINA Y
SUS RECEPTORES.**

**Jimena Pita Santibáñez
Licenciada en Ciencias Biológicas
Directores: Adela Rovira Loscos
Leandro Soriano Guillén
Laboratorio de Endocrinología
Fundación Jiménez Díaz-Capio**



FUNDACION JIMENEZ DIAZ - CAPIO

Laboratorio Endocrinología y Nutrición
Avda. de Reyes Católicos, 2
28040 Madrid, España
Telf.: 34-915504860
e-mail: arovira@fjd.es

La Dra. Adela Rovira Loscos, Jefe del Servicio de Endocrinología y Profesor Asociado de la Universidad Autónoma de Madrid y el Dr. Leandro Soriano Guillén, Médico Adjunto del Servicio de Pediatría y Profesor Asociado de la Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICA QUE:

Jimena Pita Santibáñez, Licenciada en Ciencias Biológicas, se incorporó al Laboratorio de Endocrinología y Nutrición de la Fundación Jiménez Díaz en el año 2004.

Dña. Jimena Pita Santibáñez ha realizado la tesis doctoral titulada EFECTO DE PIOGLITAZONA Y ROSIGLITAZONA SOBRE LAS FORMAS MOLECULARES DE ADIPONECTINA Y SUS RECEPTORES bajo nuestra dirección en el Laboratorio de Endocrinología y Nutrición perteneciente al Servicio de Endocrinología de la Fundación Jiménez Díaz – Capió.

Dra. Adela Rovira Loscos
Jefe de Servicio de Endocrinología
Fundación Jiménez Díaz – Capió

Dr. Leandro Soriano Guillén
Médico Adjunto del Servicio de Pediatría
Fundación Jiménez Díaz – Capió

RESUMEN

La obesidad es hoy en día un problema médico que deriva en multitud de patologías asociadas normalmente a resistencia a la insulina como son el síndrome metabólico, la diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares.

El reciente descubrimiento de la adiponectina, proteína con propiedades antidiabéticas, anti-inflamatorias y anti-aterogénicas, podría ser un nuevo frente desde el que abordar el entendimiento y tratamiento de estos desordenes.

La adiponectina actúa a través de sus formas moleculares y de dos receptores que se expresan en tejidos sensibles a la insulina como son el músculo, el hígado y el tejido adiposo. Los efectos de la adiponectina sobre sus tejidos diana depende muy posiblemente de la distribución de sus formas moleculares.

Pioglitazona y rosiglitazona, agonistas del receptor PPAR- γ y clásicamente usados en el tratamiento de la diabetes tipo 2, tienen efectos sobre la vía de la adiponectina, pero poco se conoce sobre los efectos sobre la distribución de sus formas moleculares y la expresión de sus receptores.

El objetivo de esta tesis profundizar en el conocimiento de las formas moleculares de adiponectina y sus receptores y del efecto que los agonistas PPAR- γ pudieran tener sobre ello. Para la realización de este objetivo, se ha planteado como modelo de estudio a la rata Zucker obesa, modelo de obesidad que presenta hiperinsulinemia y resistencia a la insulina.

Los resultados de este estudio indican que ambos medicamentos: a) tienen efectos insulinosensibilizadores parecidos, disminuyen el índice HOMA y los niveles plasmáticos de insulina y ácidos grasos; b) aumentan el transporte de glucosa estimulado por insulina y el contenido total de GLUT-4 en el músculo esquelético; c) producen un cambio en la distribución de las formas moleculares de adiponectina en plasma que se asocia a cambios en índice de sensibilidad a adiponectina (S_A) pero no a cambios en los niveles de las formas moleculares; d) aumentan la expresión del receptor adipoR1 en el músculo esquelético y que rosiglitazona aumenta también la expresión del receptor adipoR2 en el hígado.

SUMMARY

Obesity is nowadays a major medical problem that produces many diseases that cluster round insulin resistance, like the metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus and cardiovascular diseases.

Adiponectin, a novel protein characterized for having antidiabetic, anti-inflammatory and anti-atherogenetic properties could be a new approach to understand and to treat these diseases.

Adiponectin acts through both its different molecular forms and its receptors. The adiponectin receptors are present in insulin sensitive tissues, like muscle, liver and adipose tissue. The effects of adiponectin on its target tissues could depend on the adiponectin molecular forms distribution.

Pioglitazone and rosiglitazone, PPAR- γ receptor agonists, are compounds classically used in the treatment of type 2 Diabetes Mellitus. These compounds act on adiponectin route, but little is known about their effect on the adiponectin molecular forms distribution and its receptors.

The aim of this thesis is to have a more insight on the effect of the PPAR- γ agonist on adiponectin molecular forms distribution and on adiponectin receptors. To address this goal we have study the Zucker fatty rat, a model of obesity with hyperinsulinemia and insulinresistance.

The results of this study indicate that both drugs: a) produce similar insulin sensitizing effect, the HOMA index, plasma insulin levels and plasma free fatty acids levels are decreased; b) increase insulin-stimulated glucose transport and total Glut-4 content in skeletal muscle; c) modify adiponectin molecular forms distribution in plasma that is associated with changes in the adiponectin sensitivity index (S_A) but not with changes in the plasma levels of the molecular forms; d) increase adipoR1 receptor expression in skeletal muscle and rosiglitazone also increases adipoR2 receptor expression in liver.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

<i>El tejido adiposo: un órgano endocrino</i>	1
<i>Obesidad y síndrome metabólico</i>	3
<i>Receptores PPAR. Tiazolidinedionas</i>	4
<i>Adiponectina</i>	6
<i>Formas moleculares de adiponectina</i>	9
<i>Receptores de adiponectina</i>	13
<i>Acciones de la adiponectina</i>	15

OBJETIVOS	19
------------------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1 Animales

<i>1.1.1 Ratas obesas Zucker</i>	20
<i>1.1.2 Tratamiento</i>	20

1.2 Sondas ADN	21
-----------------------------	----

1.3 Anticuerpos	22
------------------------------	----

2. MÉTODOS

2.1 Determinación de parámetros plasmáticos

<i>2.1.1 Glucosa sanguínea</i>	22
<i>2.1.2 Insulina</i>	23
<i>2.1.3 Ácidos grasos</i>	23
<i>2.1.4 Factor de necrosis tumoral alpha, TNF-α</i>	23
<i>2.1.5 Adiponectina total y formas moleculares</i>	23

2.2 Determinación del transporte de glucosa

<i>2.2.1 Preparación de las fibras musculares</i>	23
<i>2.2.2 Captación de glucosa</i>	24
<i>2.2.3 Cálculo del transporte de glucosa</i>	24

2.3 Análisis del factor de transcripción kappa B, NF- κ B

<i>2.3.1 Extracción de proteínas nucleares</i>	25
<i>2.3.2 Determinación de la concentración de proteínas</i>	25
<i>2.3.3 Análisis de activación mediante EMSA</i>	26

2.4 Preparación y análisis de proteínas

<i>2.4.1 Obtención de proteínas totales</i>	26
<i>2.4.2 Obtención de proteínas totales mediante lisis celular</i>	27
<i>2.4.3 Determinación de la concentración de proteínas</i>	27
<i>2.4.4 Análisis de proteínas mediante ELISA</i>	27
<i>2.4.5 Análisis de proteínas mediante Western-Blot</i>	27
<i>2.4.6 Análisis de formas moleculares de adiponectina mediante Western-Blot en condiciones no reductoras y no desnaturizantes</i>	29

2.5 Preparación y análisis de ARN

<i>2.5.1 Obtención de ARN</i>	29
-------------------------------------	----

2.5.2 Electroforesis y transferencia de ARN	30
2.5.3 Análisis de ARN mediante Northern-Blot	30
2.6 Análisis estadístico	31
RESULTADOS	
1. CARACTERÍSTICAS DE LOS GRUPOS DE RATAS. PESO	32
2. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	
2.1 Glucosa	33
2.2 Insulina	33
2.3 Ácidos grasos	35
2.4 Índice de resistencia a insulina, HOMA	36
3. TRANSPORTE DE GLUCOSA	37
4. GLUCOTRANSPORTADOR TIPO 4 (GLUT-4)	38
5. PARÁMETROS INFLAMATORIOS:	
5.1 Factor de necrosis tumoral alpha, TNF- α	39
5.2 Molécula de adhesión endotelial VCAM-1	39
5.3 Molécula de adhesión endotelial ICAM-1	39
5.4 Factor de transcripción kappa B (NF- κ B)	41
6. ADIPONECTINA	
6.1 Identificación de las formas moleculares	41
6.2 Adiponectina plasmática:	
6.2.1 Total	42
6.2.2 Formas moleculares	43
6.3 Adiponectina tisular: tejidos adiposos:	
6.3.1 Total	45
6.3.2 Formas moleculares	46
6.4 Expresión de adiponectina en el tejido adiposo	48
7. RECEPTORES DE ADIPONECTINA.	
7.1 Expresión de adipoR1:	
7.1.1 Músculo esquelético	49
7.1.2 Hígado	49
7.2 Expresión de adipoR2:	
7.2.1 Hígado	50
8. CORRELACIONES	51

9. RESUMEN DE RESULTADOS	52
DISCUSIÓN	
<i>Efecto Insulonsensibilizador de las tiazolidinedionas</i>	<i>53</i>
<i>Adiponectina y formas moleculares de adiponectina</i>	<i>54</i>
<i>Receptores de adiponectina</i>	<i>59</i>
CONCLUSIONES	63
BIBLIOGRAFÍA	64

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
μCi	Microcurio
μg	Microgramo
μl	Microlitro
Acrp30	Adipocyte complement-related protein of 30 kDa
AdipoR1	Receptor 1 de la adiponectina
AdipoR2	Receptor 2 de la adiponectina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Adpn-HMW	Adiponectina de alto peso molecular
Adpn-LMW	Adiponectina de bajo peso molecular
Adpn-MMW	Adiponectina de peso molecular medio
apM1	Adipose most abundant gene transcript-1
AMPK	Proteína kinasa activada por AMP
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BCA	Ácido Bicinconínico
BSA	Albúmina de suero bovino
Con	Control
cpm	Cuentas por minuto
db/db	Diabetic genotype mutations
DTT	Ditiotreitol
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
fa/fa	Homocigoto para la mutación fa
g	Gess
GAPDH	Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa
GBP28	Gelatin binding protein of 28 kDa
GLUT-4	Proteína transportadora de la glucosa tipo 4
h	Hora
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2-etanosulfónico
HOMA	Homeostasis Model Assessment
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IMC	Índice de masa corporal
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramo
KHB	Tampón bicarbonatado Krebs-Henseleit
KK Ay	Sobreexpresión de proteína agouti
L	Litro
LXR	Receptores X del hígado
M	Molar
meq	Miliequivalente
min	Minutos
mg	Miligramo
mM	Milimolar
mm	Milímetro
ml	Mililitro
mmol	Milimol
nm	Nanometro
nmol	Nanomol

MOPS	Ácido Morfolinopropanosulfónico
ob/ob	Obese genotype mutations
OMS	Organización Mundial de la Salud
PMSF	Fenilmetil sulfonil fluoruro
PPAR	Receptor activado por proliferador del peroxisoma PPAR
Pio	Pioglitazona
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa
Rosi	Rosiglitazona
RIA	Radioinmunoensayo
S _A	Índice de sensibilidad a la adiponectina
SDS	Dodecil sulfato sódico
SSC	Buffer citrato sódico salino
TAS	Tejido adiposo subcutáneo
TAV	Tejido adiposo visceral
TBS	Buffer Tris-salino
Tris	Tris (hidroximetil)aminometano
TZD's	Tiazolidinedionas
u.a.	Unidades arbitrarias
V	Voltio
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular 1
ZRF	Rata Zucker obesa

INTRODUCCIÓN

El tejido adiposo: un órgano endocrino

El tejido adiposo es principalmente conocido por su capacidad de almacenar energía en forma de triglicéridos pero desde hace más de una década se ha reconocido como un órgano endocrino que participa en la regulación del metabolismo energético y en respuestas inflamatorias e inmunes. Estas funciones las realiza mediante la secreción de numerosas proteínas denominadas de forma genérica adipocinas. Las adipocinas son en su mayoría factores hormonales capaces de actuar de forma paracrina, autocrina y endocrina (87, 90) y contribuyen a la regulación de numerosos y variados procesos como el apetito, la sensibilidad a la insulina, la inflamación y la aterogénesis. Las adipocinas ejercen su acción tanto a nivel central, en el sistema nervioso central, como a nivel periférico en tejidos como el músculo esquelético, el hígado y el endotelio vascular.

En la tabla 1 se describen las adipocinas conocidas, la diversidad de las distintas adipocinas abarca un amplio espectro de funciones entre las que se pueden destacar:

- Implicación en el sistema inmune: el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) y la interleukina-6 (IL-6).
- Factores de crecimiento: factor de crecimiento transformador beta (TGF- β).
- Pertenencia a la vía alternativa del complemento: adipsina.
- Implicación en la regulación de distintos procesos tales como:
 - o Presión: angiotensinogeno.
 - o Coagulación sanguínea: inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1).
 - o Homeostasis de la glucosa: adiponectina, resistina, visfatina, leptina.
 - o Angiogénesis: Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).

Tabla 1. Adipocinas: sustancias proteicas y no proteicas producidas y secretadas por el tejido adiposo blanco.

Sustancia	Año	Efecto Biológico
Leptina	1994	Señalización sobre almacenamiento de energía (SNC).
Adiponectina	1995	Incrementa la sensibilidad a insulina, tiene propiedades anti-inflamatorias y anti-aterogénicas.
Resistina	2001	Aumenta la resistencia a insulina.
TNF- α	1975	Lipolítica, incrementa el consumo de energía y reduce la sensibilidad a insulina.
Interleukina-6		Pro-inflamatoria, lipolítica, reduce la sensibilidad a insulina.
Adipsina		Activa la vía alternativa del complemento.
ASP		Estimula la síntesis de triacilglicerol en TAB.
Angiotensinogeno		Precursor de la angiotensina II, regula la tensión arterial.
PAI-1		Inhibe la activación del plaminógeno bloqueando la fibrinólisis.
Factor Tisular		Inicia la cascada de coagulación.
VEGF		Estimula la angiogénesis en TAB.
Visfatina	2005	Insulinomimética, producida básicamente en TAV.
Monobutirin*		Vasodilatador, factor neovascularizante.
TGF- β		Regula varios procesos en el TAB: proliferación de preadipocitos, diferenciación, desarrollo y apoptosis de adipocitos.
IGF-1		Estimula la proliferación y diferenciación de adipocitos.
HGF		Estimula la diferenciación y desarrollo de adipocitos.
MIF		Inmunoregulador con acción paracrina sobre el TAB.
LLP**		Estimula la hidrólisis de los triacilgliceroles de las lipoproteínas (quilomicrones y VLDL).
CETP**		Transfiere ésteres de colesterol entre lipoproteínas.
Apo-E**		Componente de las lipoproteínas, especialmente VLDL.
Prostaglandinas*	1935	Reguladores de muchos procesos celulares, inflamación, coagulación sanguínea, ovulación y secreción de ácido gástrico.
Estrógenos*	1929	Producidos por la acción de la aromatasa: principal fuente de estrógenos en hombres y mujeres posmenopáusicas.
Glucocorticoides*	\approx 1900	Generados por la acción de la deshidrogeneasa 11-hidroxiesteroide tipo II que transforma cortisona en cortisol en el TAB.
Apelina	2005	Sus acciones biológicas no están muy claras pero se relacionan con el almacenamiento de energía.

ASP: Proteína Estimuladora de Acilación, IGF-1: Factor de Crecimiento 1, HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos, MIF: Factor inhibidor de la migración de macrófagos, LLP: Lipoproteína lipasa, CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol, SNC: Sistema nervioso central, TAB: Tejido Adiposo Blanco, TAV: Tejido Adiposo Visceral, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.

* Sustancias no proteicas.

** Proteínas sin acción hormonal.

La importancia de algunas funciones endocrinas del tejido adiposo descubiertas en los últimos años ha hecho que se postule la hipótesis de que una inadecuada regulación del entramado de adipocinas puede contribuir a la patogénesis de la resistencia a la insulina y de enfermedades asociadas como la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y la enfermedad cardiovascular (67).

Obesidad y síndrome metabólico

La obesidad, considerada actualmente una enfermedad crónica, y los desordenes asociados a esta, han aumentado de forma mundial en la últimas décadas, poniendo en riesgo la salud presente y futura de los humanos. Así, la Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que mas de un billón de personas adultas tienen sobrepeso, de las cuales, 300 millones cumplen criterios de obesidad según el baremo del Índice de Masa Corporal (IMC) (The World Health Report 2002: Reducing Risks, Promoting Healthy Life, World Health Organization, Geneva, 2002).

La obesidad es uno de los componentes más frecuentes del denominado síndrome metabólico. Este síndrome es un cuadro clínico en el que se asocian dos o más de los siguientes trastornos: hipertensión arterial, intolerancia a la glucosa, hipertrigliceridemia, niveles séricos disminuidos de HDL-colesterol y acumulación de grasa abdominal. Este síndrome cursa con resistencia a la insulina y suele acompañarse de estados protrombóticos y proinflamatorios. La obesidad por si sola puede inducir todos los síntomas del síndrome metabólico, que a su vez, se asocia a numerosos problemas de salud como hígado graso no alcohólico, aterosclerosis, desordenes degenerativos como la demencia, síndrome de apnea del sueño, desordenes inmunes como el asma, y ciertos tipos de cáncer (33, 95, 108). De esta forma, las personas que padecen este síndrome tienen altas probabilidades de desarrollar enfermedad cardiovascular y diabetes mellitus tipo 2.

El síndrome metabólico se relaciona casi siempre con resistencia a la insulina, término utilizado para definir la incapacidad de los tejidos extrapancreáticos (tejido adiposo, músculo e hígado) para responder de forma adecuada a la insulina. La resistencia a la insulina de estos tejidos se

asocia fundamentalmente a la obesidad abdominal o visceral que se caracteriza por un acúmulo de tejido adiposo en el interior del abdomen, en tejidos espláncnicos y en el omento (50, 63). En modelos animales de obesidad, el papel de la obesidad visceral en la resistencia a la insulina es claro, en estos modelos la retirada quirúrgica de esta grasa mejora el efecto de la insulina sobre la producción de glucosa en el hígado (5).

Un modelo animal que representa bien los trastornos metabólicos asociados a la obesidad es la rata Zucker obesa (fa/fa), modelo experimental caracterizado por presentar obesidad y resistencia a la insulina. Las ratas Zucker obesas tienen una mutación puntual del receptor de la leptina lo que provoca insensibilidad a la leptina y un metabolismo alterado de esta proteína (23, 84). Este modelo animal de resistencia a la insulina y obesidad presenta normoglicemia y niveles circulantes elevados de insulina, triglicéridos, y colesterol (116, 117). Además, se ha demostrado que la función endotelial de estos animales está alterada, porque presentan una atenuación en la habilidad de la insulina a oponerse a los efectos vasoconstrictores de la norepinefrina, situación previa al desarrollo de hipertensión (106).

Receptores PPAR. Tiazolidinedionas

En los últimos diez años el estudio de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) ha sido muy importante en el avance del entendimiento del síndrome metabólico. Estos receptores están implicados en la regulación del balance energético, traduciendo señales nutricionales en patrones específicos de expresión génica. Por ello, se ha considerado que los PPARs, pueden tener un papel patogénico en la manifestación de los distintos factores involucrados en el síndrome metabólico. Los PPARs presentan tres isoformas, α (PPAR- α), γ (PPAR- γ) y δ (PPAR- δ , también conocida como β , PPAR- β) que se diferencian en su distribución tisular y en las condiciones fisiológicas bajo las que se activan. Así, PPAR- γ se expresa predominantemente en el tejido adiposo y de forma menos abundante en hígado, músculo esquelético, colon, placenta y células inmunes como monocitos y macrófagos, (83). Por

otra parte, este receptor regula la adipogénesis y modula el almacenamiento de lípidos.

La importancia de los receptores PPAR- γ en la regulación de la homeostasis de la glucosa se empezó a considerar cuando se descubrió que los antidiabéticos tiazolidinedionas (TZD's), también denominados glitazonas, son potentes agonistas de estos receptores. La activación de los receptores PPAR- γ produce una mejoría en la sensibilidad a la insulina que puede estar mediada por dos mecanismos:

- El primero se relaciona con una disminución de la lipotoxicidad. La activación de PPAR- γ promovería la acumulación de lípidos en el tejido adiposo, disminuyendo la lipólisis. El efecto final es un aumento de triglicéridos en el tejido adiposo y una bajada de triglicéridos y ácidos grasos en plasma evitando así su infiltración en otros tejidos, principalmente, hígado y músculo lo que hace que mejore la sensibilidad a insulina (73, 74, 104).
- El segundo mecanismo se relaciona con cambios en la secreción de adipocinas (25, 34, 37, 38). La activación de PPAR- γ podría inhibir la expresión de TNF- α , IL-6 y resistina y favorecer la producción de adiponectina. Todo ello contribuiría a una mejora de la sensibilidad a la insulina (114).

Estos dos mecanismos se centran en acciones directas de la TZD's en los adipocitos. Pero dado que los PPAR- γ se expresan también en el músculo esquelético y se ha postulado otra teoría que considera que la mejoría de la sensibilidad a la insulina producida por los agonistas PPAR- γ se debe a su acción en el tejido muscular. Los estudios realizados en ratones knockout para PPAR- γ en tejido adiposo tratados con TZD's apuntan a que la expresión del receptor en este tejido no es necesaria para que se produzcan los efectos insulinosensibilizadores de las TZD's (39). Sin embargo, los estudios hechos en ratones knockout para PPAR- γ en el músculo esquelético arrojan resultados contradictorios ya que pueden o no responder al tratamiento con TZD's (40, 72). Por lo tanto, sigue en debate el protagonismo entre el tejido adiposo y el músculo esquelético como responsables del efecto insulinosensibilizador de las TZD's.

Una de las estrategias utilizadas en el tratamiento de la DM2 es la activación de PPAR- γ mediante la administración de TZD's, entre estas sustancias se encuentran los fármacos pioglitazona y rosiglitazona. Estos compuestos aumentan la sensibilidad a insulina en las células del hígado, tejido adiposo y músculo, produciendo una reducción de la producción hepática de glucosa y un aumento de la utilización de la glucosa por el músculo esquelético. La mejoría del control glucémico se asocia a una disminución de las concentraciones plasmáticas de insulina tanto en ayunas como posprandial. Otros efectos beneficiosos de la pioglitazona y de la rosiglitazona son una modificación en el perfil lipídico que tiende a ser menos aterogénico, una estabilización del equilibrio dinámico de mecanismos proantitrombóticos en el endotelio y una reducción de los niveles de presión arterial, microalbuminuria, factores procoagulantes y respuesta inflamatoria (21, 104).

Adiponectina

Otro gran avance en la comprensión de los trastornos metabólicos asociados a la obesidad ha sido el descubrimiento de la adiponectina, adipocina que modula el metabolismo de los lípidos y de la glucosa (10) y tiene propiedades insulinosensibilizadoras, anti-inflamatorias y anti-aterogénicas (17, 55, 81, 110). Además, la adiponectina podría ser uno de los mediadores de los efectos insulinosensibilizadores de las glitazonas. Un dato que sugiere la participación de esta proteína en el mecanismo de acción de las glitazonas es que los ratones knock-out para adiponectina, obesos y resistentes a insulina, presentan una peor respuesta al tratamiento con agonistas PPAR- γ (71).

La adiponectina es una proteína de 244 aminoácidos y 30 kDa de peso que se expresa y secreta exclusivamente por los adipocitos. Curiosamente, la expresión y secreción de adiponectina se da tanto en el tejido adiposo blanco como en tejido adiposo marrón (48) de humanos y animales de experimentación, siendo la principal fuente de adiponectina el tejido adiposo blanco.

Esta proteína fue descubierta en 1995 por cuatro grupos independientes por lo que se la conoce por distintos nombres. Un primer grupo la identificó por ser el gen más expresado del tejido adiposo y la denominó apM1 (adipose most abundant gene transcript-1) (64), un segundo grupo la aisló de plasma humano y la denominó GBP28 (gelatin binding protein of 28 kDa) (70). Por último, el homólogo de adiponectina en ratón fue clonado por otros dos grupos que la denominaron AdipoQ (45) o Acrp30 (adipocyte complement-related protein of 30 kDa) (88).

El gen responsable de la codificación de la adiponectina se encuentra en el cromosoma 3q27 y pertenece a la superfamilia de proteínas solubles que comparten homología con los colágenos VIII y X y con el factor del complemento C1q. Su estructura primaria contiene tres dominios (Figura 1):

- Un pequeño dominio N-terminal que contiene una secuencia señal y no tiene homología con ningún dominio conocido de proteínas.
- Un dominio con homología al colágeno.
- Un dominio C-terminal denominado dominio globular.

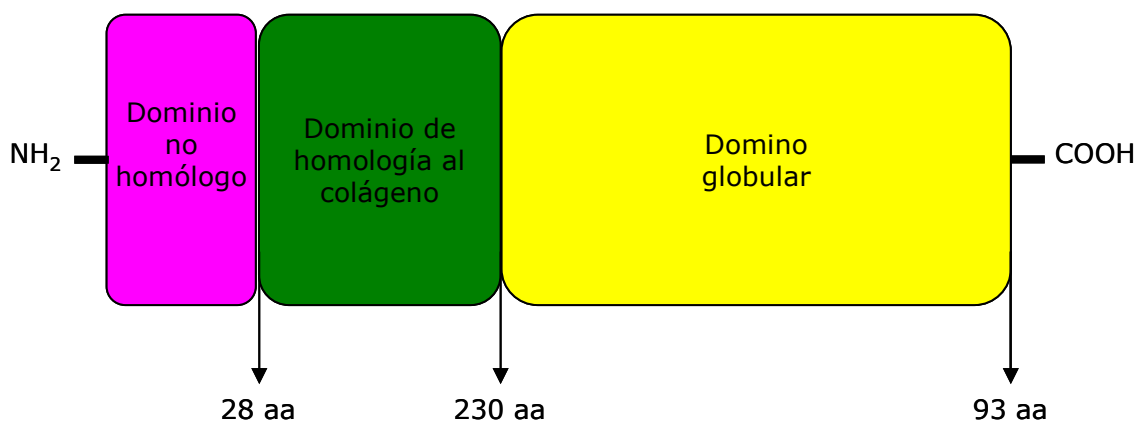


Figura 1. Secuencia primaria de la adiponectina.

El dominio con homología al colágeno consiste en 22 repeticiones de Gly-X-Pro o Gly-X-X y el dominio globular presenta gran homología con los dominios globulares del factor de complemento C1q y de la proteína sérica específica de hibernación mamífera Hib27. Las secuencias de aminoácidos de humanos y roedores presentan un 50% de homología en el dominio N-terminal, un 79% de homología en el dominio con homología al colágeno y

un 91% de homología en el dominio C-terminal. La alta homología encontrada en este último dominio hace pensar que sea un dominio importante para preservar sus funciones.

La expresión de adiponectina en el tejido adiposo se encuentra reducida en humanos obesos y en modelos de roedores obesos (45, 53), obesos diabéticos e insulinoresistentes (4, 45, 114). La expresión de adiponectina puede aumentar con el tratamiento con TZD's (66, 69), pero hay estudios en los que no se ha descrito este aumento (13, 86). Además, la expresión de adiponectina está inhibida por muchas sustancias como insulina, catecolaminas, glucocorticoides, citoquinas (IL-6, TNF- α), prolactina, hormona del crecimiento y andrógenos (57, 69).

A nivel plasmático, la adiponectina presenta niveles relativamente altos en humanos y roedores murinos llegando a representar aproximadamente el 0.01% de las proteínas totales de plasma (3).

Los niveles plasmáticos de adiponectina están reducidos en estados de obesidad asociados o no a resistencia a la insulina y/o a DM2, tanto en personas (1, 3, 42, 45, 114) como en modelos animales (114). Esta proteína también se encuentra reducida en personas con enfermedad coronaria (78). Además, niveles bajos de adiponectina se han asociado a incrementos en el índice de masa corporal (IMC), pérdidas de sensibilidad a insulina, aumentos de marcadores inflamatorios, perfiles lipídicos alterados e incremento en el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular (42, 44, 98).

Aunque no se puede descartar que los niveles bajos de adiponectina sean consecuencia de los estados a los que se asocian, los datos sugieren que la hipoadiponectinemia es un determinante para el desarrollo de estas patologías y no una consecuencia de las mismas. Estudios realizados en primates, con obesidad inducida por dieta, muestran una bajada progresiva de la adiponectina según van aumentando el peso y aparece la resistencia a la insulina, esta disminución de los niveles de adiponectina es previa a la aparición de DM2 (43). En humanos, niveles plasmáticos bajos de adiponectina podrían predecir el riesgo de desarrollar DM2 incluso si no están presentes otros indicadores de diabetes, mientras que personas con

niveles altos de adiponectina tienen menos riesgo de desarrollar esta patología (61, 91).

Formas moleculares de la adiponectina

En la circulación, la adiponectina puede existir en al menos tres complejos multiméricos o formas moleculares completas diferentes (45, 64, 88). Estas formas han sido identificadas como la adiponectina de bajo peso molecular (90 kDa) o trímero de adiponectina (adpn-LMW) (22), la adiponectina de peso molecular medio (180 kDa) o hexámero de adiponectina (adpn-MMW) y la adiponectina de alto peso molecular (>300 kDa, adpn-HMW). La síntesis y ensamblaje de adiponectina es compleja, el trímero de adiponectina, compuesto por tres subunidades de adiponectina, se produce a través de la interacción de los residuos carboxiterminales de las cabezas globulares (89) y es la unidad básica a partir de la cual se forman el resto de las formas moleculares. El hexámero de adiponectina o adpn-MMW se produce por la interacción covalente de dos trímeros mediante un puente disulfuro a través de las cisteínas en posición 39 en ratones y en posición 36 en humanos (105). La adpn-HMW se forma por la unión de varios hexámeros también a través de puentes disulfuro y contiene de 12 a 18 unidades triméricas de adiponectina (79). Además de estos complejos, la adiponectina podría circular como forma globular que es una forma truncada que incluye el dominio globular de adiponectina (32) y, recientemente, se ha descrito la presencia en plasma humano de adpn-LMW unida a albumina (28) (Figura 2).

No está claro si las distintas formas que se encuentran en la circulación son secretadas por los adipocitos, o sí en la circulación hay procesos de ensamblaje y reducción de las formas moleculares. La variabilidad encontrada se puede deber al modelo estudiado o las técnicas utilizadas. A este respecto, las hipótesis que se barajan son:

- Secreción de adpn-HMW y adpn-MMW por el tejido adiposo y formación de adpn-LMW en la circulación a partir de las dos isoformas de mayor peso molecular. Según Pajvani et al (79), el tejido adiposo secreta tanto in vivo como in vitro adpn-HMW y adpn-MMW. En la circulación estas dos formas

no se intercambian pero son precursores de la adpn-LMW. La presencia de adpn-LMW en el suero es muy transitoria y como consecuencia de un estímulo metabólico. A partir de este estímulo metabólico, una reductasa sérica reduce los complejos de mayor peso molecular para dar lugar a esta isoforma. Este proceso se produce en la superficie celular de las células diana de forma que adpn-LMW se une a sus receptores y se elimina rápidamente. Estos mecanismos explican la baja detección de adpn-LMW en la circulación. No obstante, otros autores refieren la presencia de adpn-LMW en el suero (100).

- Secreción de las tres formas moleculares a través de dos vías de secreción distintas. Una vía para la secreción de adpn-HMW y otra vía para la secreción de adpn-MMW y adpn-LMW. Estas vías se encontrarían reguladas de forma diferente (111). En esta misma línea se ha postulado que la secreción de adpn-MMW y adpn-LMW sería constitutiva mientras que la secreción de adpn-HMW estaría regulada (13).
- Secreción de adpn-HMW por los adipocitos. La adpn-HMW sería la única forma secretada. Posteriormente, en la circulación se formarían a partir de ella las formas de menor peso molecular, adpn-MMW y adpn-LMW (13).

Independientemente del mecanismo de secreción y formación de las formas moleculares, en la circulación adpn-HMW y adpn-MMW son las formas mas abundantes (32), la concentración sérica de adpn-LMW es muy baja y no siempre detectable y la forma globular circulante no ha sido detectada bajo condiciones fisiológicas normales.

Los cambios en la distribución de las formas moleculares en plasma suelen estar asociados a cambios en la expresión de adiponectina y a cambios en los niveles de adiponectina total plasmática, además, los cambios producidos suelen ocurrir a expensas de cambios en la adpn-HMW. Aunque este patrón suele ser el habitual, hay casos en los que no se cumple esta situación (56, 80).

Los cambios en la distribución de las formas moleculares en el plasma no siempre se corresponden con cambios en la distribución de las mismas en el tejido adiposo (111). Esta diferencia en la distribución entre plasma y tejido adiposo se puede deber a cambios en la eficiencia de secreción de una

forma u otra por el tejido adiposo, que es el mecanismo que se le atribuye a la testosterona (111) o a cambios en el aclaramiento de la adiponectina.

Las distintas formas moleculares de la adiponectina tienen distinta actividad como se describe en los apartados siguientes. Se ha visto que la formación y la distribución de las distintas formas de adiponectina son necesarias para su correcta actividad, de hecho la presencia de mutaciones, G84R (35, 103) y G90S (103), que se asocian a fenotipos de resistencia a insulina implican defectos en la formación de las formas moleculares. Para la formación de los complejos son imprescindibles varios procesos de hidroxilación y glicosilación post-traduccionales que afectan a varias lisinas del dominio de homología al colágeno de la proteína (108) y la conservación de la cisteína en posición 39 a través de la cual se forman los puentes disulfuro (99).

Si bien niveles bajos de adiponectina total se asocian o son, en parte, responsables de multitud de estados asociados a resistencia a la insulina, a raíz de estudios sobre las formas moleculares, se ha hipotetizado que la actividad anti-diabética y anti-aterogénica de la adiponectina depende muy posiblemente de la distribución de las formas moleculares en el plasma (80).

La forma molecular de mayor peso molecular, adpn-HMW, es considerada como la forma biológicamente más activa y la que posiblemente sea más relevante en la regulación de la sensibilidad a insulina y la protección frente a DM2. Además, los niveles de esta forma molecular parecen ser un mejor biomarcador en la predicción de resistencia a insulina, síndrome metabólico y DM2. En este sentido, los siguientes estudios han apuntado a la importancia de adpn-HMW:

- En el plasma de ratones, la adpn-HMW está reducida tanto en estados de hiperglucemia como en estados de hiperinsulinemia (79).
- En pacientes con resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2 (DM2), la adpn-HMW se encuentra selectivamente más baja (6), además, se han caracterizado dos mutaciones raras G84R (35, 103) y G90S (103) que se asocian a fenotipos de hipoadiponectinemia y DM2. Estas mutaciones afectan al dominio de colágeno evitando la formación de este complejo (105).

- En ratones transgénicos (ratones Tg) que expresan tres veces mas adiponectina, se ha demostrado que la elevación crónica en la circulación de adpn-HMW tiene un efecto positivo sobre la sensibilidad a la insulina, sobre todo, del hígado (20).
- En un estudio de regresión múltiple la correlación significativa encontrada entre la adiponectina total, la adpn-HMW y la adpn-LMW con parámetros de adiposidad central y con la captación de glucosa estimulada por insulina se comprobó que los niveles de adpn-HMW eran los responsables de estas correlaciones (30).

La importancia de la relación entre adpn-HMW y la sensibilidad a la insulina ha llevado a la propuesta de calcular el llamado índice de sensibilidad a la adiponectina (S_A) que resulta del cociente entre adpn-HMW y la adiponectina total. Mediante este índice conocemos la contribución de adpn-HMW al contenido total adiponectina (80). Los siguientes estudios apuntan a la importancia del índice S_A :

- Tanto en ratones como en personas la sensibilidad a insulina se correlaciona con S_A pero no siempre se correlaciona con la adiponectina total (80).
- Se ha descrito una correlación entre los niveles de adpn-HMW y distintos parámetros relacionados con la homeostasis de glucosa en una cohorte en la que se incluyeron 68 individuos (33 mujeres y 35 hombres) con o sin DM2 (59). S_A se correlacionó más significativamente con los niveles de insulina y de glucosa que los niveles de adiponectina total, sugiriendo que las alteraciones en los niveles plasmáticos de adpn-HMW son más sensibles que los niveles totales de adiponectina para predecir el nivel de resistencia a la insulina.
- Finalmente, los niveles de adpn-HMW medidos con un ELISA específico para esta forma y el índice S_A son los valores más potentes para predecir resistencia a la insulina y síndrome metabólico en humanos (36).

La adpn-HMW no solo parece ser la forma responsable de la relación entre adiponectina y sensibilidad a insulina, sino que parece que a través de esta forma se produce la regulación de los niveles de adiponectina.

En humanos, los niveles de las formas moleculares en plasma son dependientes del sexo. Durante el desarrollo puberal, los niveles de

adiponectina total sufren una bajada en los varones, principalmente debido a una bajada de adpn-HMW (19, 79). La diferencia entre varones y mujeres adolescentes en los niveles de adiponectina total y adpn-HMW se debe en parte a la inhibición de la secreción de esta isoforma por la testosterona (111) y muy presumiblemente al aumento de la grasa corporal de las mujeres durante adolescencia (85). En adultos este dimorfismo sexual de la adiponectina podría ser en parte responsable de la mayor incidencia de aterosclerosis, y la mayor susceptibilidad a desarrollar resistencia a la insulina en los hombres (31, 51).

El tratamiento con TZD's aumenta la adiponectina total plasmática, a expensas de la adpn-HMW pero no de las otras dos formas moleculares (80). Por ello, se considera que adpn-HMW un mejor indicador de la mejoría en la sensibilidad a insulina producida por las TZD's (97).

Receptores de adiponectina

La adiponectina ejerce sus efectos metabólicos a través de la interacción con sus receptores adipoR1 y adipoR2. Los receptores de adiponectina son proteínas integrales de membrana, que componen un nuevo grupo de receptores con 7 dominios transmembrana distintos estructural, topológica y funcionalmente de los receptores acoplados a proteínas G y que se caracterizan por presentar el dominio N-terminal hacia el interior de la célula y el C-terminal hacia el exterior (112). AdipoR1 y adipoR2 sirven de receptores tanto a la forma globular de adiponectina como a las formas completas de adiponectina (48), pero con distintas afinidades.

Los receptores de adiponectina se expresan en tejidos sensibles a insulina como son el músculo, el hígado, y el tejido adiposo (112) pero también se ha visto que se expresan en macrófagos (22), células β del páncreas (54), y cardiomiocitos (26). AdipoR1 es ubicuo, pero se expresa de forma abundante en el músculo esquelético. Este receptor tiene alta afinidad por todas las formas de adiponectina pero se une preferentemente a la forma globular. Por otra parte, adipoR2 se expresa fundamentalmente en el hígado y se une preferentemente a las formas completas de adiponectina (47, 48, 112).

Los estudios sobre los receptores de adiponectina sugieren que están regulados por factores hormonales, nutricionales y metabólicos, especialmente por la insulina y por los estados de ayuno y no ayuno (46, 101) aunque hay estudios que no lo confirman (11, 92). Otros factores que modifican la expresión de los receptores de adiponectina son los agonistas PPAR- α y PPAR- γ (22, 26, 52, 60, 93, 94, 102), la adiponectina (7), la hormona del crecimiento (29), los agonistas LXR (22), los oleatos (54) y las dietas altas en grasas (92).

Ratones con deficiencias en adipoR1 y adipoR2 desarrollan resistencia a la insulina. Por otro lado, el aumento de su expresión en el hígado de ratones diabéticos aumenta la actividad de la Proteína Kinasa Activada por AMP (AMPK) en este tejido. Estos datos sugieren la implicación de estos dos receptores en estados de resistencia a la insulina in vivo (115).

La expresión de los receptores de adiponectina es más baja en el tejido adiposo de distintos modelos de experimentación con resistencia a la insulina (11, 102) pero estudios de la expresión en otros tejidos como el músculo y el hígado han dado resultados conflictivos. En el estado diabético encontramos resultados dispares. Así, en humanos se ha encontrado una expresión más baja en el tejido muscular de individuos normales con historia familiar de DM2 (15) pero no se encontraron alteraciones en el tejido muscular de personas con DM2 comparados con individuos normales (24). En modelos animales no se han descrito alteraciones en las ratas zucker diabéticas (db/db) en ninguno de los dos receptores ni en músculo, ni en hígado, ni en tejido adiposo (68). Sin embargo, si se ha descrito una menor expresión de los dos receptores en tejido adiposo de ratones diabéticos KKAy (102) y de adipoR1 en músculo, hígado y tejido adiposo de ratones db/db (11).

Los receptores de adiponectina se han implicado claramente con estados de resistencia a la insulina. Sin embargo, su papel en este proceso sigue cuestionándose, ya que, los niveles de expresión en los distintos tejidos pueden depender del modelo estudiado y de las causas de la resistencia a la insulina. Independientemente a este debate es una creencia general que un aumento en la expresión de los receptores puede aumentar la sensibilidad a insulina. La idea de que los receptores de adiponectina pueden aumentar la

sensibilidad a insulina ha sido puesta en duda en un reciente estudio (12). En es estudio se apunta a la posibilidad de que los receptores 1 y 2 de adiponectina tengan papeles opuestos. En este estudio, ratones knockout para adipoR1 presentaban obesidad e intolerancia a la glucosa mientras que ratones knockout para adipoR2 estaban protegidos del aumento de peso inducido por dieta y aumentaban la tolerancia a la glucosa. No obstante, esta hipótesis requiere de estudios adicionales, ya que, es posible que la mejora de sensibilidad a insulina en relación a los receptores de adiponectina dependa del balance de expresión entre ellos.

Acciones de la adiponectina

La adiponectina tiene múltiples funciones biológicas. La administración de esta proteína mejora la sensibilidad a la insulina en ratones obesos y en ratones lipoatróficos la resistencia a la insulina remite completamente con la administración de dosis fisiológicas de adiponectina y leptina y parcialmente con la administración de cualquiera de las dos (114). Por último, su administración mejora la sensibilidad a la insulina en modelos de ratón deficientes en adiponectina que se hicieron insulino-resistentes a través de dietas ricas en grasa (65). También se han descrito acciones anti-aterogénicas, ya que, la adiponectina inhibe la unión de monocitos a células endoteliales y suprime la transformación de macrófagos en células espumosas (75-77). Además, se ha visto que la adiponectina tiene propiedades anti-inflamatorias (110) y en modelos murinos se ha descrito que la forma globular produce pérdida de peso (32).

El papel insulinosensibilizador de la adiponectina parece ser debido a los efectos que tiene fundamentalmente en hígado y en músculo esquelético. La adiponectina disminuye la producción de glucosa por el hígado (9, 18), aumenta el transporte de glucosa en el músculo (113) y disminuye el contenido de triglicéridos en ambos tejidos. Este último efecto tiene distintas causas que parecen estar conectadas. En músculo, la administración de adiponectina, aumenta la β -oxidación de ácidos grasos (32) y aumenta la expresión de moléculas involucradas en el transporte de ácidos grasos y en procesos de combustión y disipación de energía,

mientras que en el hígado disminuye la expresión de moléculas involucradas en el transporte de triglicéridos hacia el interior de la célula (114).

Los efectos desencadenados por la adiponectina son muy parecidos a los ocurridos en el músculo y en el hígado por la activación de la AMPK. Este hecho, llevó a pensar que la adiponectina puede actuar mediante la estimulación de esta molécula. La AMPK es conocida por activar procesos que producen energía como la β -oxidación de ácidos grasos y el transporte de glucosa y desactivar los que la consumen como la síntesis de proteínas, la lipogénesis y la gluconeogénesis. En el músculo la activación de AMPK produce un aumento del transporte de glucosa mediante el aumento de la translocación del transportador 4 de la glucosa (GLUT-4) y un aumento de la β -oxidación de ácidos grasos mediante la regulación de Acetil-CoA Carboxilasa (ACC), AMPK inactiva a ACC de forma directa fosforilandola (49, 109). En hígado, la activación de AMPK produce una disminución de la gluconeogénesis mediante la regulación de enzimas involucradas en esta ruta como la Fosfoenolpiruvato Carboxilasa (PECK) y la Glucosa-6-Fosfatasa (G6Pase) (62, 87). La relación entre adiponectina y AMPK ha sido confirmada por estudios de inactivación de AMPK previa a la estimulación con adiponectina (96, 113) y por estudios que describen la falta de efecto de adiponectina sobre la producción de glucosa en hígado en ratones deficientes en AMPK. En este sentido, hay un estudio que demuestra que la cascada de señalización que parte de la activación de AMPK es necesaria para la acción de adiponectina (16).

Los efectos producidos por adiponectina son específicos de cada forma molecular y de cada tejido (99, 105) (Figura 2). En músculo, se han visto diferencias a dos niveles, intensidad y cascadas de activación. Todas las formas moleculares de adiponectina, incluyendo la cabeza globular, son capaces de activar a AMPK en músculo y es la adiponectina globular la que mejor y más eficientemente actúa sobre este tejido (32, 113). En estudios "*in vitro*" en mioblastos C2C12 diferenciados a miotúbulos se han visto diferencias entre la acción de las distintas formas moleculares (100). Adpn-HMW y adpn-MMW son capaces de activar la cascada de señalización de NF- κ B mientras que las otras dos formas moleculares, adpn-LMW y la cabeza globular, no producen este efecto.

En el hígado parece que los efectos biológicos sólo se dan si está presente la adpn-HMW (16, 105, 113).

En otro tejido en el que se han visto diferencias en la acción de las formas moleculares es en las células endoteliales, solo adpn-HMW es capaz de suprimir la apoptosis de estas células, este efecto de nuevo es mediado por AMPK (56).

En resumen, las TZD's son sustancias que mejoran la sensibilidad a insulina y podrían ejercer parte de sus acciones a través de la adiponectina y sus receptores. El efecto de las TZD's sobre la adiponectina y la distribución de sus formas moleculares se considera un efecto exclusivo de estos compuestos, ya que, los agonistas PPAR- α no presentan estos efectos (80).

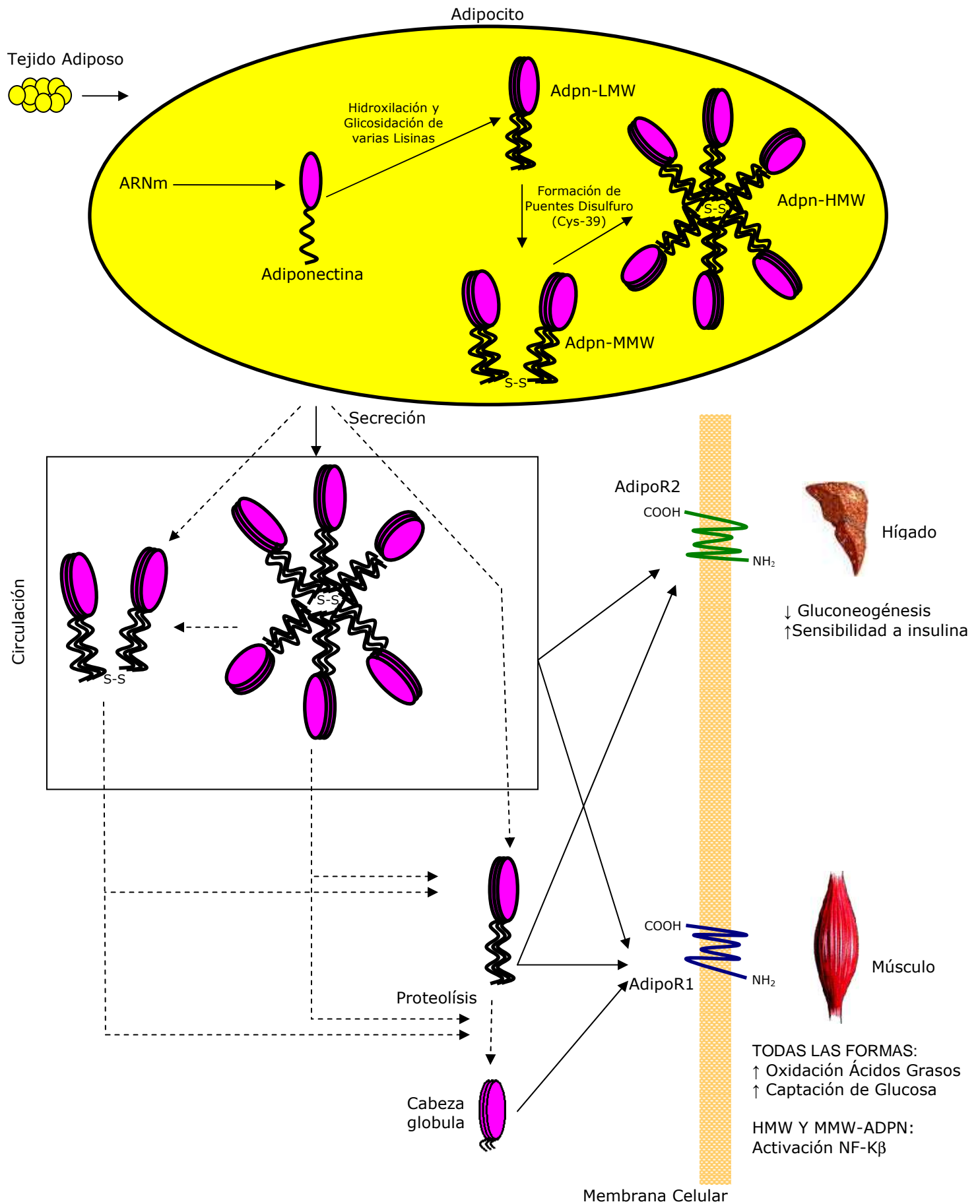


Figura 2. Formación de adiponectina y acción en tejidos muscular e hígado.

OBJETIVOS

La adiponectina puede ser uno de los mediadores de las acciones de las tiazolidinedionas. Los efectos de las tiazolidinedionas sobre el tejido adiposo y sobre la adiponectina, ya que es exclusiva de este tejido, pueden ser previos a los efectos causados en otros tejidos, principalmente músculo esquelético e hígado.

Las posibles acciones de la adiponectina pueden depender de sus formas moleculares y de su concentración en el plasma y, además, la adiponectina tiene receptores en el músculo esquelético y en el hígado. Los niveles de adipoR1 y adipoR2 en estos tejidos también pueden influir en las acciones de la adiponectina, ya que los receptores se distribuyen de manera distinta en estos tejidos y tienen afinidades distintas por las formas moleculares.

El objetivo de este estudio ha sido profundizar en el conocimiento de la adiponectina y de sus receptores y su relación con cambios en la sensibilidad a la insulina.

Para ello, se han estudiado los efectos de las tiazolidinedionas, fármacos insulinosensibilizadores, en ratas macho Zucker obesas (fa/fa) que presentan un cuadro metabólico caracterizado por obesidad, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, hiperlipemia e intolerancia a la glucosa, sobre:

1. La expresión de adiponectina en el tejido adiposo y la abundancia de esta adipocina y de sus formas moleculares en el tejido adiposo y en la circulación.
2. La expresión de los receptores de adiponectina, adipoR1 y adipoR2, en músculo esquelético e hígado.
3. La relación entre los cambios producidos en la concentración de la adiponectina y de sus formas circulantes, así como en la expresión de los receptores adipoR1 y adipoR2 y la mejoría de la sensibilidad a insulina.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1 Animales

1.1.1. Ratas obesas Zucker

Para este estudio se eligió el modelo de rata Zucker obesa (fa/fa) que se caracteriza por intolerancia a la glucosa, dislipidemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina.

Un total de treinta ratas Zucker obesas (ZRF, fa/fa) macho se obtuvieron a la edad de 4 semanas de Harlan Ibérica S.L. Durante todo el estudio fueron alimentadas con pienso estándar y agua ad libitum y acondicionados en jaulas con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas en una habitación con humedad relativa del aire del 45-50% y temperatura de 22-24°C.

1.1.2. Tratamiento

A la edad de 6 semanas, después de dos semanas de acondicionamiento, las ratas fueron repartidas aleatoriamente en 3 grupos de 10 para recibir un tratamiento de 6 semanas con placebo (grupo control), pioglitazona (Lilly S.A, Madrid, España, grupo pio) o rosiglitazona (GlaxoSmithKline, Brentford, Inglaterra, grupo rosi).

Cada una de las ratas asignadas a grupos con medicamento recibió 3 mg/kg·dia de pioglitazona o rosiglitazona diluidas en carboximetilcelulosa, el grupo control recibió carboximetilcelulosa. El tratamiento fue administrado diariamente durante el tiempo indicado mediante sonda oral, el peso se anotó semanalmente para reajustar las dosis.

Cada 15 días, tras un periodo de ayuno de unas 12 horas, se extrajo sangre de la cola y tras la determinación del contenido de glucosa en sangre se procedió a la obtención del plasma de las muestras. Al finalizar el tratamiento, las ratas fueron anestesiadas mediante inyección intraperitoneal de pentotal sódico, se realizó exsanguinación mediante punción cardiaca y se obtuvo y guardó el plasma. El tejido adiposo visceral y subcutáneo, aorta, hígado, corazón y músculos gastronemios fueron retirados y guardados a -70°C para futuros experimentos.

Los músculos sóleos se extrajeron y fueron inmediatamente preparados para realizar los experimentos de transporte de glucosa.

Todos los protocolos utilizados y que requieren el uso de animales fueron aprobados por el Comité ético de experimentación animal de la Fundación Jiménez Díaz-Capio de Madrid.

1.2. Sondas ADN

En los estudios de Northern-Blot se utilizaron sondas específicas para adiponectina, adipoR1, adipoR2 y Glicerualdehido Fosfato Deshidrogenasa (GAPDH) (Metabion Internacional AG, GMBH, Planegg/Mastinsried, Alemania) que se obtuvieron a partir de sondas diseñados mediante el estudio de las secuencias descritas en la base de datos GeneBank para estos genes. La secuencia y características de las sondas se describen en la tabla 2.

Para obtener las sondas, 30 µg de ARN total, se amplificaron por RT-PCR en las condiciones y con las secuencias nucleótidos descritas en la tabla. La sonda se purificó utilizando el kit comercial Wizard PCR Prep., DNA Purification System (Promega, Fitchburg, EEUU) y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2% para comprobar que era la deseada según tamaño.

Tabla 2. Sondas Northern-Blot: Secuencia y características de las sondas utilizadas. TM: Temperatura de meeting, N° pb: Número de pares de bases.

Sonda	Accesion Number	Secuencia	Nº Ciclos	TM	Nº pb
ADPN	BC092565	Sense 5' AATCCTGCCCAGTCATGAAG 3' Antisense 5' CATCTCCTGGGTCACCCCTTA 3'	40	59°C	215
ADIPOR1	BC061838	Sense 5' ATGACTACCTGCTACATGGCCA 3' Antisense 5' GTGTCCAGATGTTGCCAGTTTC 3'	40	62°C	102
ADIPOR2	DQ148392	Sense 5' TTGCCACCCCTCAGTATCG 3' Antisense 5' AAGGTAGGGATGATTCCACTCAGA 3'	40	62°C	76
GAPDH	BC059110	Sense 5' ATGGGAAGCTGGTCATCAAC 3' Antisense 5' CCACAGTCTTCTGAGTGGCA 3'	30	62°C	375

1.3. Anticuerpos

Para los estudios de Western-Blot se utilizaron los siguientes anticuerpos específicos para rata.

- Anticuerpo policlonal Anti-GLUT-4 (1:3000, Chemicon, Temecula, EEUU)
- Anticuerpo policlonal Anti-Adiponectina (1:1500 para tejido adiposo y 1:5000 para plasma, Chemicon, Temecula, EEUU)
- Anticuerpo monoclonal Anti-CD106 VCAM-1 (1:250, BD Bioscience, San Jose, EEUU)
- Anticuerpo monoclonal Anti-CD 54 ICAM-1 (1:50, Serotec, Oxford, Inglaterra)
- Anticuerpo monoclonal Anti-Tubulina (1:2000, Sigma-Aldrich, Ronkonkoma, EEUU)

2. MÉTODOS

2.1. Determinación de parámetros plasmáticos

Los parámetros plasmáticos de este estudio se realizaron sobre muestras obtenidas tras un periodo de ayuno de unas 12 horas.

- A las 0, 2, y 4 semanas de tratamiento se obtuvieron muestras de sangre de la cola con capilares impregnados con EDTA.
- A las 6 semanas de tratamiento (final del tratamiento) se recogió sangre del corazón mediante punción cardiaca en tubos que contenían EDTA.

Tras la determinación del contenido de glucosa en sangre se obtuvo el plasma de todas las muestras mediante centrifugación a 2.000g, 15 minutos y 4°C. Las muestras se conservaron a -20°C para realizar las determinaciones en plasma de insulina, ácidos grasos y adiponectina.

2.1.1. Glucosa sanguínea

El contenido de glucosa en sangre se determinó a las 0, 2, 4 y 6 semanas a partir de una gota de sangre de la cola con tiras reactivas (Glucocard, Menarini Diagnósticos, Barcelona, España).

2.1.2. *Insulina*

Las determinaciones de insulina en plasma se realizaron en muestras de las semanas 0, 2, 4, y 6 mediante radioinmunoensayo (RIA) con kits comerciales (DRG Diagnostics, Mountainside, EEUU) específicos para rata.

2.1.3. *Ácidos grasos*

Los ácidos grasos en plasma se determinaron a las 0 y 6 semanas mediante el kit comercial NEFA C ACS-ACOD Method (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Alemania).

2.1.4. *Factor de necrosis tumoral alpha, TNF- α*

Los niveles de TNF- α en plasma se determinaron al final del tratamiento mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) con kits comerciales específicos para rata (Diaclone Research, Besancon, EEUU).

2.1.5. *Adiponectina total y formas moleculares.*

La adiponectina total se determinó en las muestras de plasma de la semana 6 mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) con kits comerciales (Linco Research, Missouri, EEUU) específicos para rata.

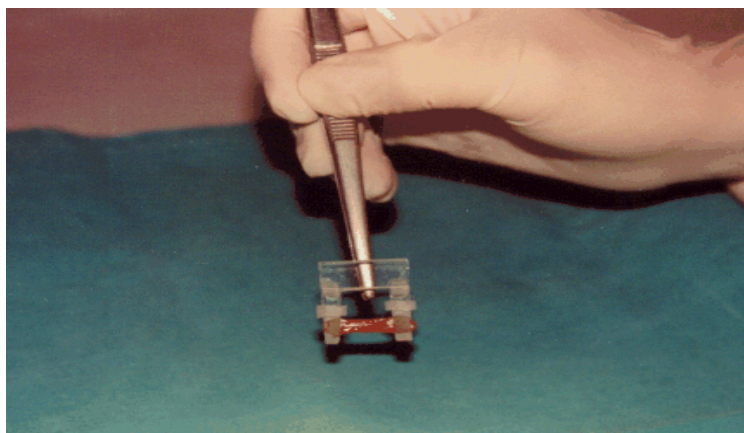
El contenido de las formas moleculares de adiponectina en plasma de la semana 6 se determinó mediante estudios de Western-Blot bajo condiciones no reductoras y no desnaturalizantes (2.4.6.).

2.2. Determinación del transporte de glucosa

2.2.1. Preparación de la fibras musculares

El día del sacrificio, se extrajeron los músculos sóleos y para evitar su contracción se montaron en pinzas de metacrilato con un diámetro interior de aproximadamente 9 mm (fotografía 1). Previamente a la realización de los experimentos, se preincubaron los músculos durante 1 hora en baño orbital a 37°C (95%O₂/5%CO₂) en tampón KHB pH 7,4 (118 mM NaCl, 4,7

mM KCl, 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,47 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,2 mM KH_2PO_4 , 25 mM NaHCO_3) conteniendo 0,1% de albúmina sérica bovina y piruvato 1mM.



Fotografía 1. Músculo clampado en pinzas de metacrilato preparado para la incubación in vitro.

2.2.2. Captación de glucosa

Los músculos sóleos se preincubaron como se describe en el apartado 2.2.1. Los últimos 10 minutos del periodo de preincubación se realizaron en ausencia o presencia de insulina a una concentración de 10^{-7} M. Posteriormente, los músculos se transfirieron a un tampón fresco de KHB que contenía 2-deoxy-D-glucosa 5 mM, 2-deoxy-D- ^3H glucosa 2 $\mu\text{Ci/ml}$, sorbitol 20 mM y ^{14}C -Sorbitol 0.11 $\mu\text{Ci/ml}$ (marcador extracelular) y se incubaron en ausencia o presencia de insulina 10^{-7} M durante una hora, la reacción se paró con KHB frío. Finalmente, se pesaron los músculos y se solubilizaron en tampón de solubilización ($\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{NBr}$ 0,3 M, KOH 0,3 M, MeOH 50%) durante 1-2 horas a 65°C .

La radioactividad presente en los músculos y en alícuotas del medio de incubación se determinó en un contador β tras añadir 5 ml de líquido de centelleo.

2.2.3. Cálculo del transporte de glucosa

La captación de glucosa por el músculo se calculó determinando la cantidad de cada isótopo (^3H y ^{14}C) presente en cada muestra (mus) y en el

espacio extracelular Los resultados se expresaron como nmol por gramo de tejido y por minuto.

$$\text{Transporte} = \frac{\left(\frac{\left({}^3\text{H cpm mus} - \left[{}^{14}\text{C cpm mus} \times \frac{{}^3\text{H cpm med}}{{}^{14}\text{C cpm}} \right] \right)}{\text{Actividad Específica } {}^3\text{H med}^*} \right)}{\text{Peso del Tejido (mg)}} \times 1000$$

60 min

*Actividad específica ${}^3\text{H}$ medio = ${}^3\text{H}$ cpm medio/250

2.3. Análisis del factor de transcripción kappa B, NF- κ B

2.3.1. Extracción de proteínas nucleares

Para la extracción de proteínas nucleares se partió de 2 g de tejido adiposo visceral o 100 mg de corazón. El tejido se homogenizó en buffer A (10 mM Hepes pH 7,9, 1,5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 0,05 mM DTT, 0,57 mM PMSF y 1 $\mu\text{l/ml}$ cocktail de inhibidores) y se centrifugó 10 minutos a 11.000 rpm y 4°C, tras la centrifugación se retiró el sobrenadante, se resuspendió el pellet de nuevo en buffer A y se centrifugó 20 minutos a 21.000 rpm y 4°C.

Una vez retirado el sobrenadante se resuspendió el pellet en buffer B (20 mM Hepes pH 7,9, 25% glicerol, 0,42 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,57 mM PMSF, 0,05 mM DTT y cocktail de inhibidores 1 $\mu\text{l/ml}$ buffer), se incubó durante 30 minutos en hielo, vorteadando frecuentemente, y se centrifugó 30 minutos a 21.000 rpm y 4°C.

Finalmente se guardó el sobrenadante a -80°C para su uso posterior.

2.3.2. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas nucleares se calculó mediante el método colorimétrico del BCA (Pierce Protein Research Products, Rockford, EEUU). Para calcular la concentración de proteína los valores de absorbancia de las muestras a 562 nm se interpolaron en una recta patrón realizada a partir de

una solución de Albúmina Sérica Bovina (BSA, 1 mg/ml) con valores entre 0 y 24 µg de BSA.

2.3.3. Análisis de activación mediante EMSA

Para los ensayos de movilidad electroforética o geles de retardo (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA) se utilizó una sonda con dos sitios de unión para NF-κB (ATCAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTT-CCG).

El ensayo de unión de ADN se inició con el marcaje radioactivo de la sonda mediante incubación durante 10 minutos a 37°C con (γ -³²P) dATP (298 µCi, Grupo Taper, Alcobendas, Madrid) y en presencia de T4 Kinasa-polinucleótido (T₄PK), la reacción de marcaje se detuvo con 1 µl de EDTA 0,5 M, pH 8.

Una vez realizado el marcaje, alícuotas de 1 µl de sonda marcada se incubaron con 15 µg de proteínas nucleares durante 30 minutos a temperatura ambiente y en presencia de binding buffer 5X, BB5X (10 mmol/L HEPES pH 7,8, 50 mmol/L KCl, 0,1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 10% glicerol, y 3 mg poly (dI-dC)).

La reacción de incubación se paró con 2 µl de buffer de carga y las muestras se sometieron a electroforesis a 250-300 V en gel de acrilamida al 4% precorrido a 100-120 V, 1h-1h 30min y en presencia de buffer TBE 0,25X (TBE 1X: 89 mmol/L Tris base, 89 mmol/L ácido Bórico, 2 mmol/L EDTA)

Finalmente, el gel se secó en un secageles, se autorradiografió y las bandas fueron cuantificadas mediante densitometría con el programa ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, EEUU).

2.4. Preparación y análisis de proteínas

2.4.1. Obtención de proteínas totales

Para los ensayos de GLUT-4 en músculo gastronemio y de VCAM-1 e ICAM-1 en aorta se extrajeron proteínas totales partiendo de 150 mg de músculo o de la aorta completa. El método utilizado fue el del trizol (Sigma-Aldrich, Ronkonkoma, EEUU) y se siguieron las instrucciones del fabricante.

2.4.2. Obtención de proteínas totales mediante lisis celular

Para los ensayos de las formas moleculares de adiponectina los extractos de proteínas totales de tejido adiposo se obtuvieron mediante lisis celular.

Brevemente, 300 mg de tejido adiposo visceral o subcutáneo fueron homogenizados con politron en 0,5 ml de buffer de homogenización (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 2 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇, 10% Glicerol, 1% Nonidet P40, 34 µg/ml PMSF, 1 µl/ml cocktail de inhibidores), tras una incubación de 45 minutos en rotación y 4°C, se centrifugó para retirar el material insoluble 30 minutos a 7.000g y 4°C. El sobrenadante se guardó a -80°C para su posterior utilización.

2.4.3. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas totales se determinó por el método colorimétrico de Bradford (14) (bradford, Bio-Rad, Hercules, EEUU).

2.4.4. Análisis de proteínas mediante ELISA

El contenido total de adiponectina en los tejidos adiposos visceral y subcutáneo fue determinado mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) con kits comerciales (Linco Research, Missouri, EEUU) específicos para rata. Los resultados se expresaron como nanogramo por miligramo de proteína.

2.4.5. Análisis de proteínas mediante Western-Blot

En este trabajo se han analizado varias proteínas de distintos tejidos por Western-Blot. La cantidad de proteína, el porcentaje de acrilamida de los geles de separación y la concentración de anticuerpo primario se ajustó a las necesidades de cada proteína y la eficacia del anticuerpo (tabla 3).

Tabla 3. Western-Blot: Características de los experimentos y las proteínas analizadas por Western-Blot.

Proteína	Tejido	Proteína (µg)	% Gel Acrilamida	Altura Banda (kDa)	Concentración Anticuerpo
GLUT-4	M. Gastromemio	100	7,5	40-43	1:3000
VCAM-1	Aorta	150	10	110	1:250
ICAM-1	Aorta	150	10	90	1:50

Para los análisis de Western-Blot alícuotas con igual cantidad de proteínas se incubaron en cocktail Laemmli (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 3% SDS, 10% Glicerol, 0,04% Azul de bromofenol, 10 mM DTT, 2% 2-mercaptoetanol) durante 16 horas a 4°C.

Tras la incubación con Laemmli las muestras se calentaron 10 minutos a 95°C, se cargaron en los geles y se procedió a su separación por electroforesis SDS-PAGE, según el método de Laemmli (58).

Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore, Billerica, EEUU) a 20 voltios durante 30 minutos. Posteriormente dichas membranas fueron bloqueadas durante 1 hora en tampón TRIS salino (TBS: 9% NaCl, 1M Tris-HCl pH 7,4) con un 10% de leche desnatada y se incubaron 16 horas a 4°C con anticuerpos primarios específicos para cada proteína a la concentración indicada (**1.3**).

Después del periodo de incubación, las membranas se lavaron alternativamente con TBS y TBS-Tween 0,05%. Para la detección de las proteínas se usaron anticuerpos secundarios (anticuerpo anti-ratón IgG para los anticuerpos primarios monoclonales o anticuerpo anti-conejo IgG para los anticuerpos primarios policlonales, Amersham Bioscience, Piscataway, EEUU) marcados con peroxidasa a una concentración 1:1500. Tras una hora de incubación a temperatura ambiente, las membranas se volvieron a lavar alternativamente con TBS y TBS-Tween 0,05%, se revelaron con el sistema ECL (Amersham Bioscience, Piscataway, EEUU), y se expusieron a placas sensibles a quimioluminiscencia (Amersham Bioscience, Piscataway, EEUU).

Al finalizar los experimentos, todas las membranas se lavaron 2 veces durante 30 minutos con TBS-Tween 0,05% para volver a usarlas y

determinar el contenido de α -Tubulina (1:2000, Sigma-Aldrich, Ronkonkoma, EEUU) que se utilizó para normalizar los resultados.

Las bandas correspondientes a cada una de las proteínas estudiadas fueron cuantificadas mediante densitometría con el programa ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, EEUU).

2.4.6. Análisis de formas moleculares de adiponectina mediante Western-Blot en condiciones no reductoras y no desnaturalizantes

Para el estudio de las formas moleculares de adiponectina se siguió el método Laemmli (58) con las siguientes modificaciones (105):

- El cocktail Laemmli utilizado no contenía ni 1,4 Ditioeritritol (DTT), ni 2-mercaptoetanol para evitar la reducción (rotura de los puentes disulfuro) de las proteínas.
- La incubación con el cocktail Laemmli no reductor se realizó durante 1h a temperatura ambiente.
- Antes de cargar las muestras en los geles no se calentaron a 95°C durante 10 minutos para evitar su desnaturalización.

La obtención de proteínas totales se realizó mediante lisis celular ya que hemos comprobado que las formas moleculares de adiponectina se modifican por el método del trizol utilizado para la obtención del resto de las proteínas totales. Para la realización de estos Western se utilizaron geles en gradiente 4-15% (Bio-Rad, Hercules, EEUU) para alcanzar una mejor resolución de las bandas, ya que, las formas moleculares de adiponectina pueden aparecer entre los 300 y los 67 kDa (105).

2.5. Preparación y análisis de ARN

2.5.1. Obtención de ARN total

Para los estudios de expresión de adiponectina (tejidos adiposos visceral y subcutáneo), adipoR1 (músculo gastronemio e hígado) y adipoR2 (hígado) se extrajo ARN total mediante la técnica del trizol (Sigma-Aldrich, Ronkonkoma, EEUU).

2.5.2. Electroforesis y transferencia de ARN

15 µg de ARN total procedente de los tejidos fueron fraccionados en geles de agarosa 1,3%, formaldehído al 6,7% y MOPS1X (MOPS10X: 0,2 M Ácido Morfolinopropanosulfónico (MOPS), 80 mM AcNa, 10mM EDTA pH 8, 1 µl/ml H₂O DEPC). Las muestras fueron desnaturalizadas en tampón desnaturalizante a 65°C durante 15 minutos y enfriadas en hielo (para evitar su renaturalización), a las muestras se les añadió 1 µl de bromuro de etidio para permitir la posterior visualización de los ARN ribosómicos en un transiluminador ultravioleta. Se añadieron 3 µl de tampón de carga (1X MOPS, 18,5% Formaldehído, 50% Formamida, 4% Ficoll400, Azul de bromofenol) por cada muestra y se sometieron a electroforesis horizontal en tampón MOPS 1X hasta que el frente de azul de bromofenol corrió aproximadamente 8-10 cm.

El ARN fue transferido por capilaridad en tampón SSC 10X pH 7 (SSC 20X: 3 M NaCl, 0,3 M Citrato Sódico) a membranas de nylon. El ARN se fijó a las membranas mediante exposición durante 1 minuto a la luz ultravioleta producida por una lámpara de 250 nm y posterior calentamiento a 80°C durante 2h.

2.5.3. Análisis de ARN mediante Northern-Blot

Una vez fijado el ARN a las membranas, éstas se prehibridaron durante 4-5h a 42°C y en rotación con una solución que contenía 50% formamida desionizada, 1X solución Denhardt (Denhardt 100X: 20 mg/ml Ficoll 400, 20 mg/ml Polivinil-pirrolidone, 20 mg/ml BSA), tampón fosfato pH 6,5 50mM, 5X SSC, 1% SDS y 0,1 mg/ml esperma de salmón desnaturalizado. Con la prehibridación se pretende bloquear las membranas para una mejor unión de sondas específicas marcadas radioactivamente.

Durante el periodo de prehibridación se realizó el marcaje radiactivo de las sondas específicas para cada ARN (descrito en apartado **1.2**) con (α^{32} -P)dCTP (136 µCi, Grupo Taper, Alcobendas, Madrid) utilizando el kit comercial Random primed DNA labeling kit (Roche, Basel, Suiza). Una vez marcada la sonda se pasó a su purificación con el kit Wizard DNA clean-up

system (Promega, Fitchburg, EEUU) y conteo de cpm en contador- β (Beckman, Fullerton, EEUU).

Después del periodo de prehibridación se pasó a hibridar las membranas durante 16-18h a 42°C y en rotación con una solución igual a la anterior pero con 10% de sulfato de dextrano y 1×10^7 cpm/ml de sonda marcada radioactivamente y desnaturalizada.

Finalmente, las membranas se lavaron tres veces con diferentes soluciones de SSC y SDS para eliminar la radioactividad inespecífica y se expusieron a películas X-Omat (Kodak, Rochester, EEUU) a -80°C.

Tras el revelado de las películas, todas las membranas se lavaron con 3% SDS 20X para volver a usarlas.

Las bandas correspondientes a cada uno de los ARNs estudiados fueron cuantificadas mediante densitometría con el programa ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, EEUU). Los resultados se normalizaron con el densitometrado correspondiente a la GAPDH y se expresaron en porcentajes respecto al grupo control.

2.6. Análisis Estadístico

Los resultados de este estudio han sido presentados con un intervalo de confianza del 95% (media \pm EEM \cdot 1.96).

Para el estudio estadístico, se utilizó inicialmente el test de Kolmogorov para comprobar la distribución que seguían los grupos de datos.

La comparación de los distintos grupos se realizó usando el método de la *t de Student* cuando los datos independientes seguían distribución normal. La prueba de *U de Mann-Whitney* se aplicó cuando las variables independientes no seguían una distribución normal.

Los estudios de correlaciones realizados en este trabajo se analizaron mediante el índice estadístico del *coeficiente de correlación de Pearson*.

Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos cuando el valor de p fue menor a 0.05 ($p < 0.05$).

Los datos fueron analizados con el programa estadístico Statistical Package for the Social Science 13.0, SPSS 13.0 (SPSS inc, Chicago, EEUU).

RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS DE LOS GRUPOS DE RATAS. PESO

El peso de los animales se recogió semanalmente. A lo largo del estudio se observó un aumento progresivo del peso en todos los grupos (Tabla 4).

Entre los grupos sólo hubo diferencias significativas en la semana 6 de tratamiento donde los animales del grupo tratado con rosiglitazona tuvieron un peso significativamente más alto que los animales del grupo control (455 ± 20.20 vs 406 ± 15.45 g, $p < 0.01$) (Figura 3).

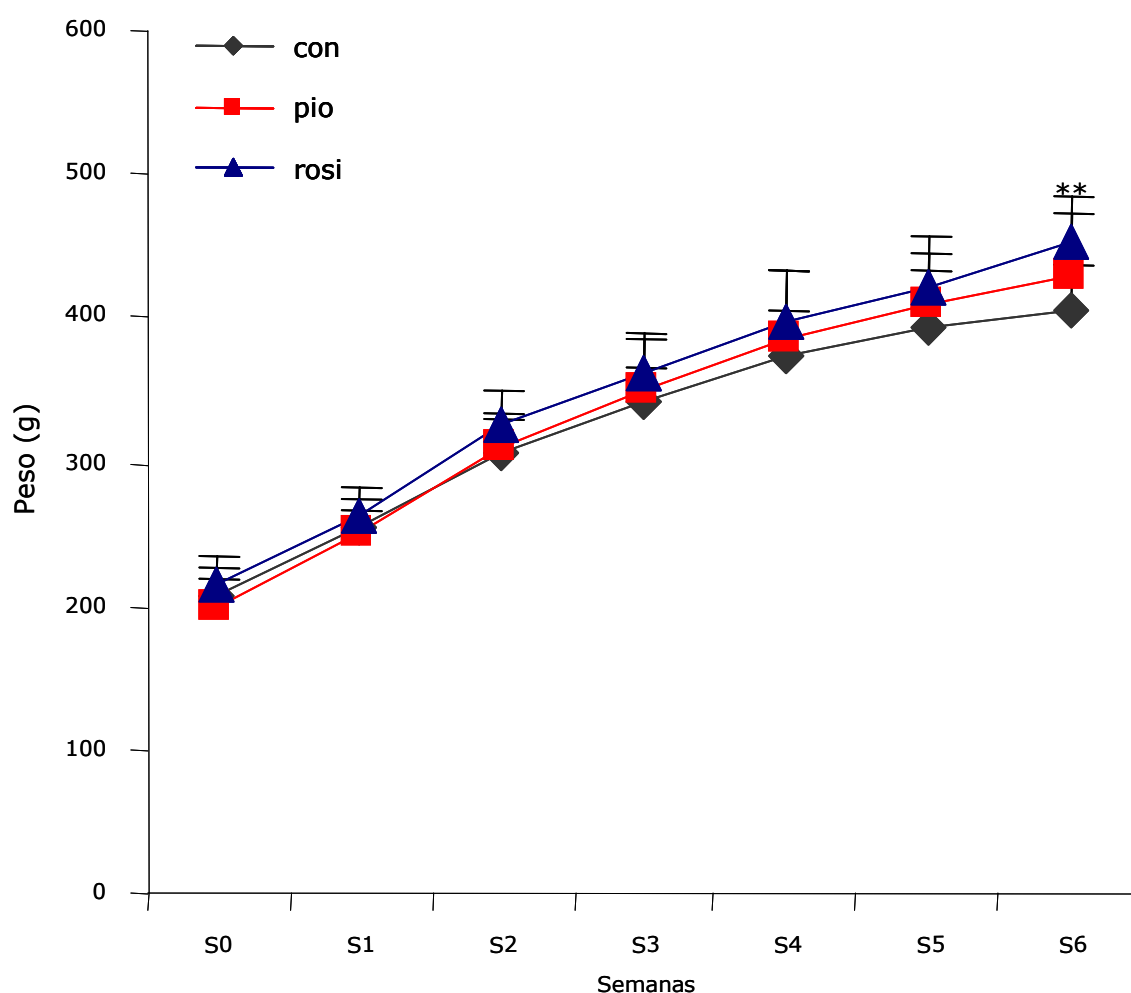


Figura 3. Peso. Evolución del peso a lo largo del tratamiento en los tres grupos de tratamiento control (con), pioglitazona (pio) y rosiglitazona (rosi). El peso se recogió en las semanas indicadas. Los resultados están expresados como media \pm S.D. **: $p < 0.01$ (con vs rosi).

2. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

2.1. Glucosa

Los grupos con tratamiento no presentaron diferencias significativas en ninguna de las semanas de estudio en comparación con el grupo control (Figura 4). En los tres grupos se detectó un aumento de la glucemia estadísticamente significativo entre las semanas 4 y 6 de tratamiento (Tabla 4).

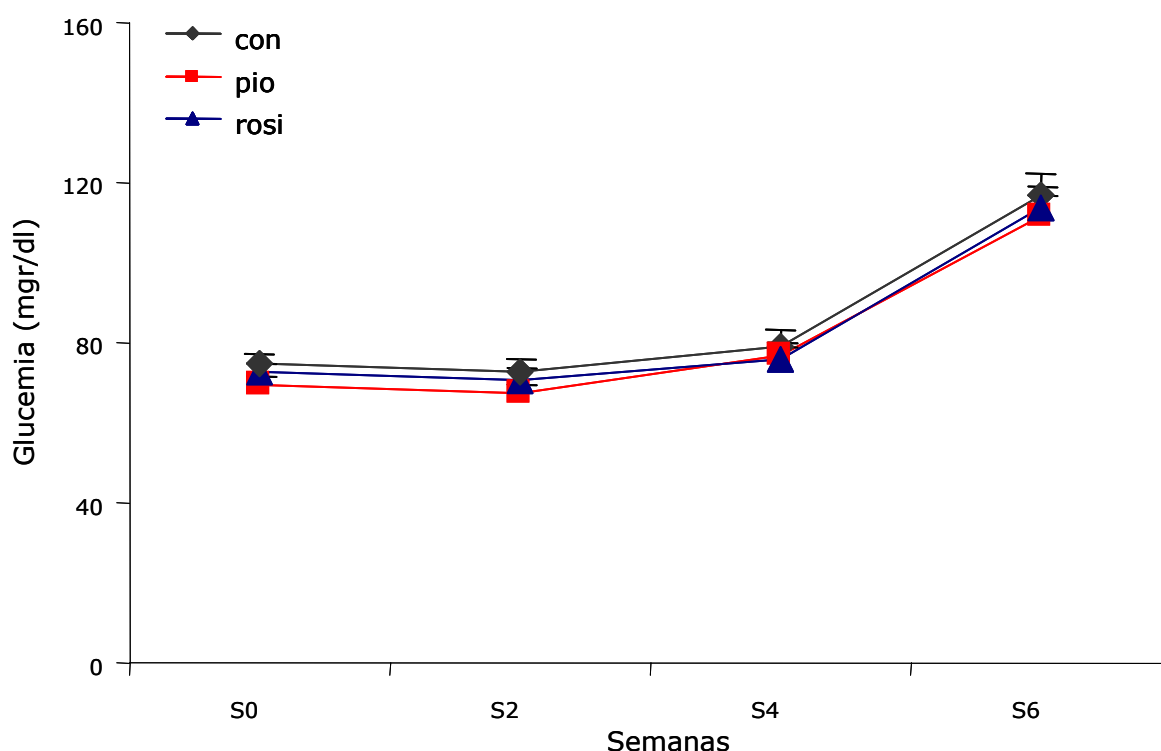


Figura 4. Glucemia. Evolución de la glucemia a lo largo del tratamiento en los tres grupos de tratamiento control (con), pioglitazona (pio) y rosiglitazona (rosi). En las semanas indicadas se tomó sangre de la cola y se midió la glucemia. Los resultados están expresados como media \pm S.D.

2.2. Insulina

Los niveles de insulina plasmáticos, después de una subida de la semana 0 a la semana 2 en todos los grupos, se mantuvieron estables en el grupo control y disminuyeron en los grupos tratados. La bajada en estos grupos se produjo entre las semanas 2 y 4, a partir de este punto, los niveles fueron estables (Tabla 4).

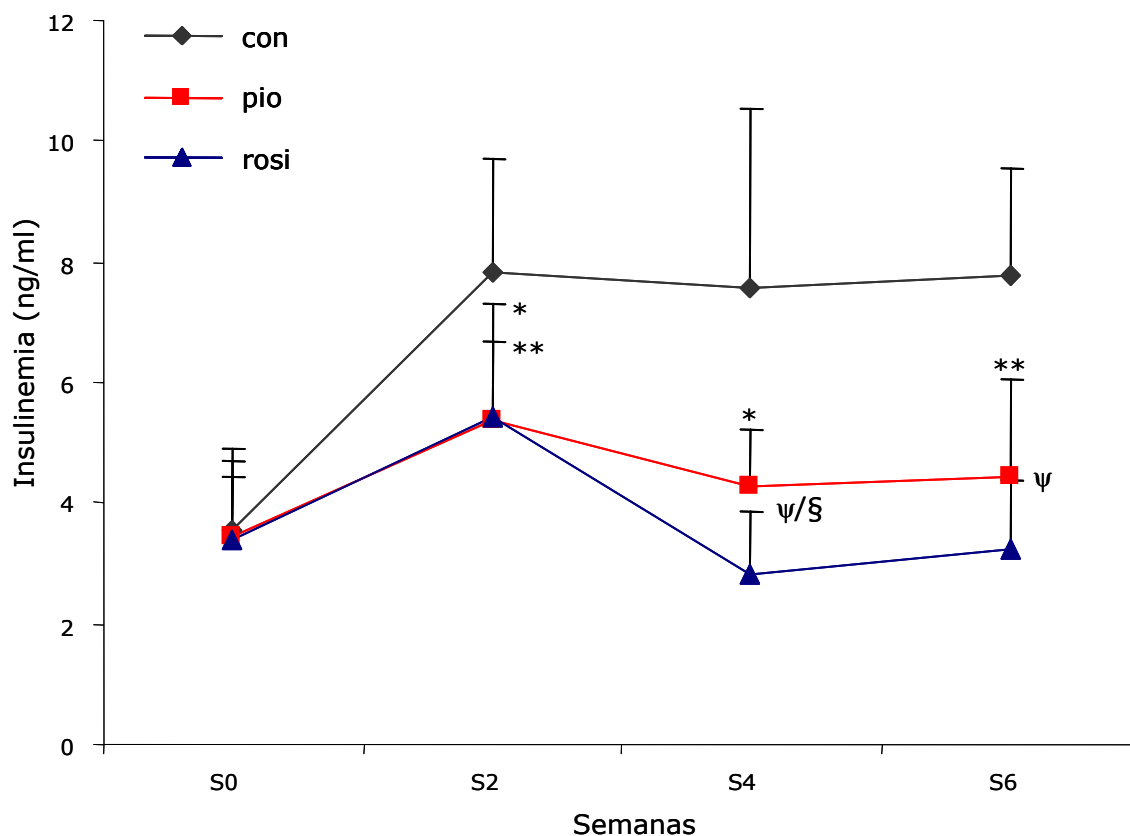


Figura 7. Insulina Plasmática. Evolución de la insulina en plasma a lo largo del tratamiento en los tres grupos de tratamiento control (con), pioglitazona (pio) y rosiglitazona (rosi). Los resultados están expresados como media \pm S.D. *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ψ ; $p < 0.001$ (con vs rosi), ξ ; $p < 0.01$ (pio vs rosi).

Al finalizar del tratamiento, los niveles de insulina habían subido significativamente en el grupo control (S0: 3.57 ± 0.78 vs S6: 7.77 ± 1.30 ng/ml, $p < 0.001$), mientras que, en los grupos con tratamiento no cambiaron con respecto al inicio del tratamiento.

Comparando los grupos, los niveles plasmáticos de insulina fueron significativamente más bajos en los grupos tratados comparados con el grupo control en la semana 2 (pio: 5.37 ± 1.32 , rosi: 5.40 ± 0.83 vs 7.84 ± 1.14 ng/ml), en la semana 4 (pio: 4.28 ± 0.66 , rosi: 2.84 ± 0.67 vs 7.55 ± 2.23 ng/ml) y en la semana 6 de tratamiento (pio: 4.44 ± 1.05 , rosi: 3.25 ± 0.33 vs 7.77 ± 1.30 ng/ml). Además, en la semana 4 de tratamiento en el grupo rosiglitazona comparado con el grupo pioglitazona estos niveles fueron significativamente más bajos (2.84 ± 0.67 vs 4.28 ± 0.66 ng/ml, $p < 0.01$) (Figura 5).

2.3. Ácidos grasos

El tratamiento con ambos fármacos disminuyó los niveles plasmáticos de ácidos grasos (S0: 1.24 ± 0.18 vs pio: 0.69 ± 0.14 y rosi: 0.76 ± 0.25 meq/L, $p < 0.01$). El grupo control no sufrió cambios al final del tratamiento con respecto al inicio del tratamiento (1.24 ± 0.18 vs 1.42 ± 0.35 meq/L) (Figura 6).

Al final del tratamiento el nivel de ácidos grasos en el plasma de las ratas de los grupos con tratamiento fue más bajo que el de las ratas del grupo control (pio: 0.69 ± 0.01 ; rosi: 0.76 ± 0.25 vs 1.42 ± 0.35 meq/L, $p < 0.01$) (Figura 6).

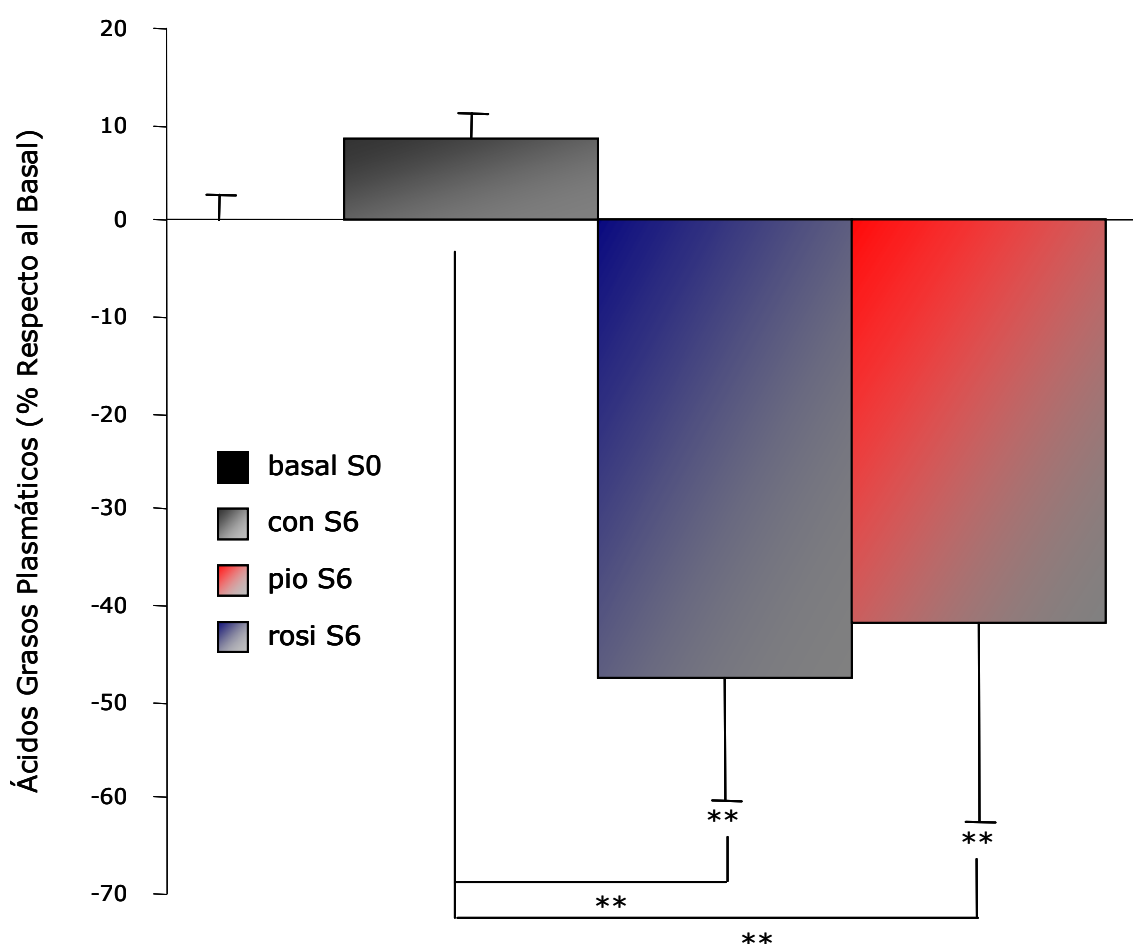


Figura 6. Ácidos grasos plasmáticos. Los ácidos grasos se midieron en muestras de plasma al inicio (S0) y final (S6) del tratamiento mediante un kit comercial en los tres grupos control (con, $n=6$), pioglitazona (pio, $n=7$), rosiglitazona (rosi, $n=7$). Los valores están expresados como porcentaje respecto al basal de la semana 0 (media \pm S.D). **, $p < 0.01$, ψ ; $p < 0.001$.

2.4. Índice de resistencia a la insulina, HOMA

Para conocer el grado de resistencia a insulina se calculó el índice de resistencia a insulina (HOMA) mediante la siguiente fórmula.

$$\text{HOMA} = \frac{\text{Insulina Plasmática } (\mu\text{U/ml}) \times \text{Glucemia (mmol/L)}}{22,5}$$

La medición de este índice mostró que los grupos tratados comparados con el grupo control presentaron una resistencia a la insulina menor desde la semana 2 de tratamiento (pio: 1.94 ± 0.43 , rosi: 2.20 ± 0.35 vs 3.33 ± 0.53 , $p < 0.01$) y hasta el final del mismo (pio: 2.90 ± 0.69 , rosi: 2.17 ± 0.45 vs 5.12 ± 0.74 , $p < 0.001$). Además, en la semana 4 de tratamiento, el grupo tratado con rosiglitazona comparado con el de pioglitazona presentó un índice HOMA menor (2.17 ± 0.45 vs 2.90 ± 0.69 , $p < 0.01$) (Figura 9).

Tabla 4. Evolución del peso y parámetros bioquímicos a lo largo del tratamiento en los tres grupos control (con), pioglitazona (pio) y rosiglitazona (rosi).

Parámetro	Grupo	Semana 0	Semana 2	Semana 4	Semana 6
Peso (g)	con	206±16.37	304±18.54 ^ψ	374±17.11 ^ψ	406±15.54*
	pio	200±11.54	309±16.25 ^ψ	387±28.54 ^ψ	431±26.45*
	rosi	214±13.92	325±15.70 ^ψ	399±20.23 ^ψ	455±20.19**
Glucemia (mg/dl)	con	75±4.59	73±3.59	79±5.35	117±11.00 ^ψ
	pio	69±4.25	67±5.94	77±4.57*	111±8.92 ^ψ
	rosi	72±5.57	71±4.49	76±4.08	114±5.86 ^ψ
Insulinemia (ng/ml)	con	3.57±0.78	7.84±1.14 ^ψ	7.55±2.23	7.77±1.29
	pio	3.46±0.61	5.37±1.33*	4.28±0.65	4.44±1.04
	rosi	3.39±0.94	5.40±0.84**	2.84±0.67 ^ψ	3.25±0.84
HOMA	con	1.57±0.25	3.33±0.53 ^ψ	2.89±0.33	5.12±0.74 ^ψ
	pio	1.42±0.31	1.94±0.43	1.93±0.24	2.90±0.69*
	rosi	1.39±0.33	2.20±0.35**	1.26±0.25**	2.17±0.45**

Resultados expresados con un intervalo de confianza del 95%. La estadística refleja los cambios producidos en cada grupo cada dos semanas. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$; ^ψ, $p < 0.001$.

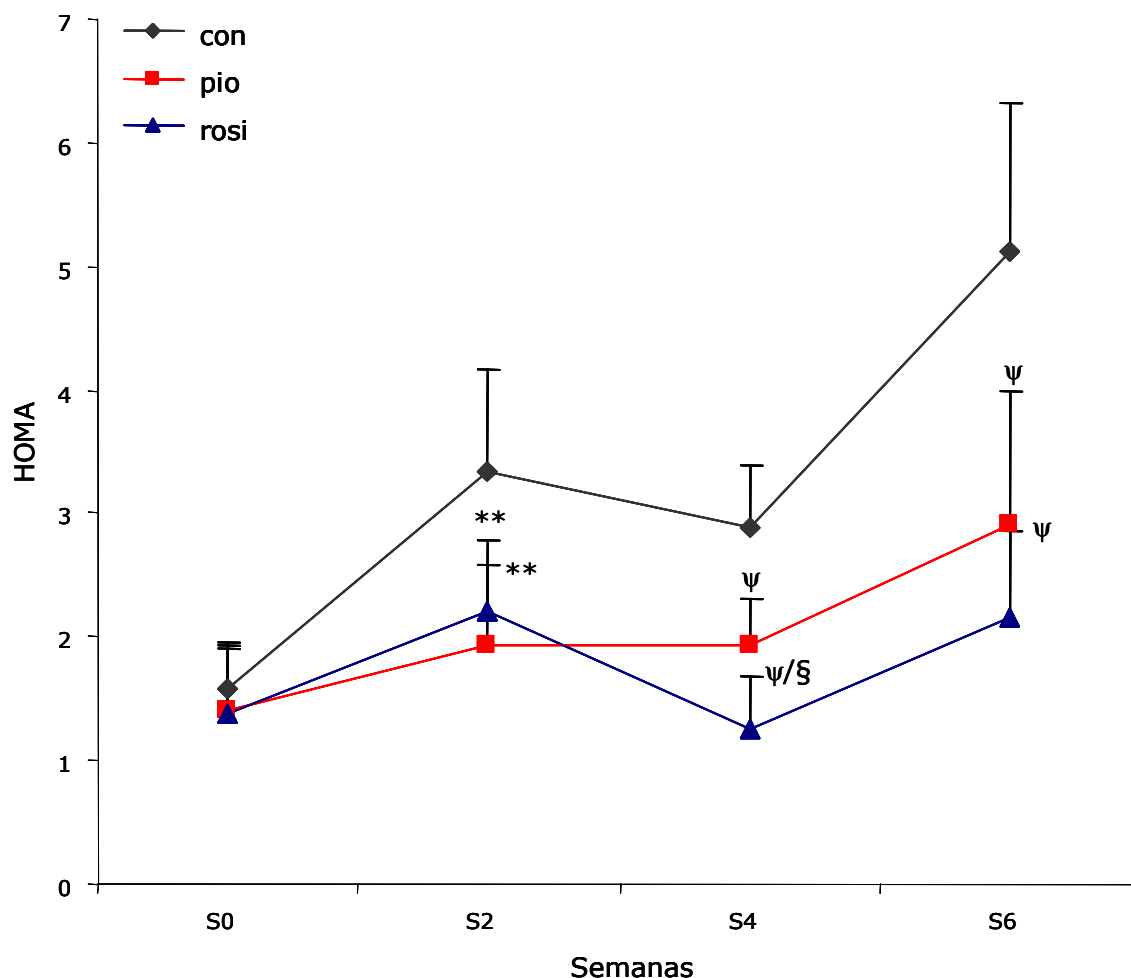


Figura 7. Índice HOMA. Evolución del índice HOMA a lo largo del tratamiento en los tres grupos control (con), pioglitazona (pio) y rosiglitazona (rosi). Los valores están expresados como media \pm S.D. **, $p < 0.01$, ψ ; $p < 0.001$, ξ ; $p < 0.01$ (pio vs rosi).

3. TRANSPORTE DE GLUCOSA

El transporte de glucosa estimulado por insulina 10^{-7} M en fibras de músculo sóleo aumentó en los dos grupos con tratamiento, tanto en el grupo pioglitazona (5.50 ± 0.51 vs 9.90 ± 3.06 nmol/gr·min, basal vs insulina 10^{-7} M; $p < 0.05$) como en el grupo rosiglitazona (5.14 ± 0.90 vs 9.86 ± 0.82 nmol/gr·min, basal vs insulina 10^{-7} M; $p < 0.001$) y no se modificó en el grupo control (7.56 ± 2.06 vs 7.14 ± 2.39 nmol/gr·min, basal vs insulina 10^{-7} M). El incremento del transporte de glucosa (transporte de glucosa estimulado por insulina – transporte de glucosa no estimulado por insulina) fue significativamente más alto en los grupos tratados comparados con el grupo control (4.30 ± 2.57 (pio, $p < 0.01$), 4.72 ± 1.10 (rosi, $p < 0.001$) vs -0.42 ± 0.60 (con) nmol/gr·min) (Figura 8).

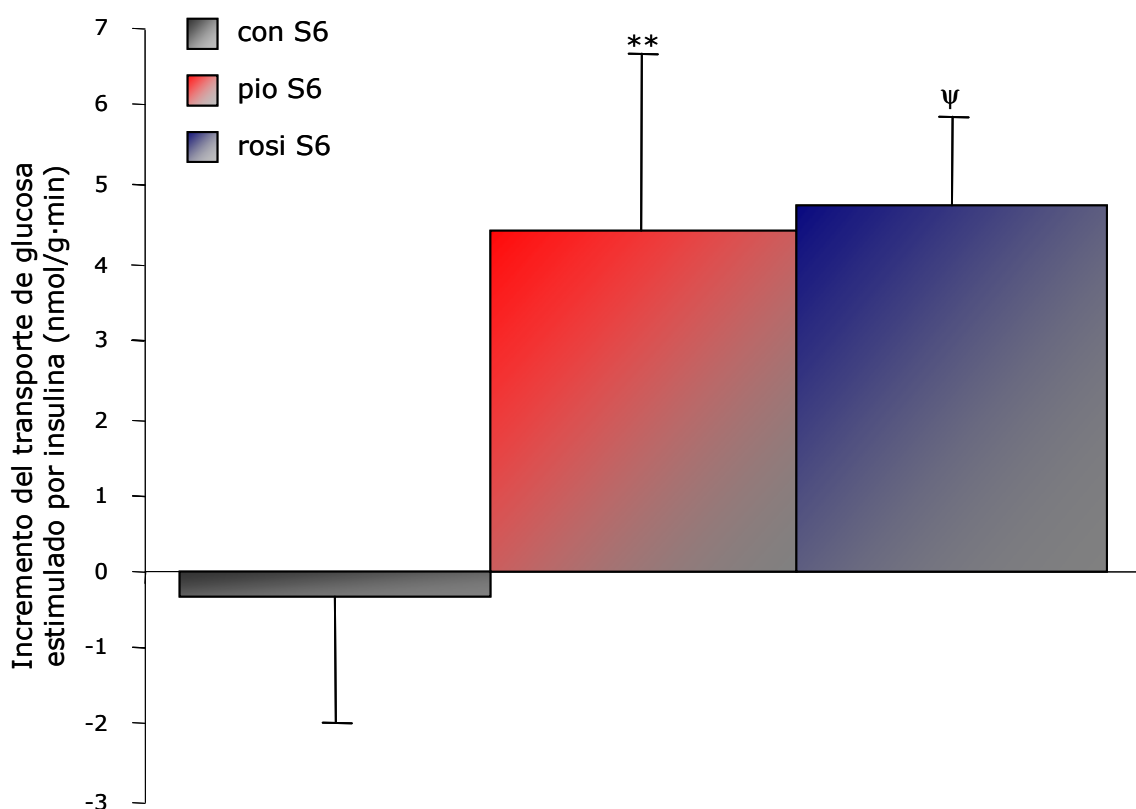


Figura 8. Transporte de glucosa. Incremento del transporte de glucosa en fibras musculares esqueléticas estimuladas con insulina (10^{-7} M) al final del tratamiento (S6). Grupos control (con, n=8), pioglitazona (pio, n=3) y rosiglitazona (rosi, n=4). Los incrementos están expresados media \pm S.D. **: $p < 0.01$, ψ : $p < 0.001$

4. GLUCOTRANSPORTADOR TIPO 4 (GLUT-4)

El contenido proteico de GLUT-4 fue estudiado por Western-Blot en el músculo gastronemio. Los resultados mostraron que en los grupos con tratamiento comparados con el grupo control los niveles de este glucotransportador fueron significativamente más altos (pio: 1.41 ± 0.27 ($p < 0.05$), rosi: 2.11 ± 0.71 ($p < 0.01$) vs 1.00 ± 0.06 u.a.) (Figura 9).

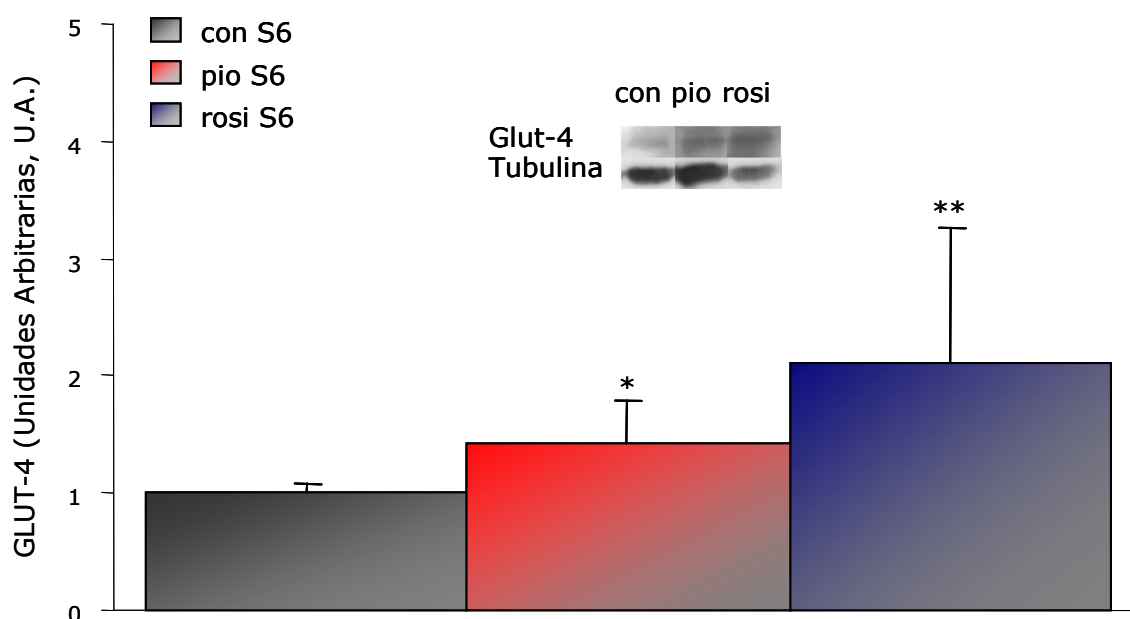


Figura 9. GLUT-4. Niveles proteicos de GLUT-4 de los grupos pioglitazona (pio, n=8) y rosiglitazona (rosi, n=9) comparados con el control (con, n=10). Los valores están expresado media \pm S.D. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$.

5. PARÁMETROS INFLAMATORIOS

5.1. Factor de necrosis tumoral alpha, TNF- α

Al final del tratamiento los niveles de TNF- α no se modificaron con respecto al control (104.14 ± 21.79 ng/ml), en ninguno de los dos grupos de tratamiento (pio: 100.80 ± 26.60 , rosi: 91.13 ± 26.07 ng/ml) (Figura 10).

5.2. Molécula de adhesión endotelial VCAM-1

Al final del tratamiento, los valores de VCAM-1 no variaron en los grupos pioglitazona (1.16 ± 0.24 u.a.) y rosiglitazona (1.07 ± 0.14 u.a.) comparados con el control (1.00 ± 0.20 u.a.) (Figura 11).

5.3. Molécula de adhesión endotelial ICAM-1

Los valores de ICAM-1 no variaron con respecto al grupo control en ninguno de los grupos tratados (con: 0.91 ± 0.16 , pio: 0.88 ± 0.25 , rosi: 1.00 ± 0.20 u.a.) (Figura 11).

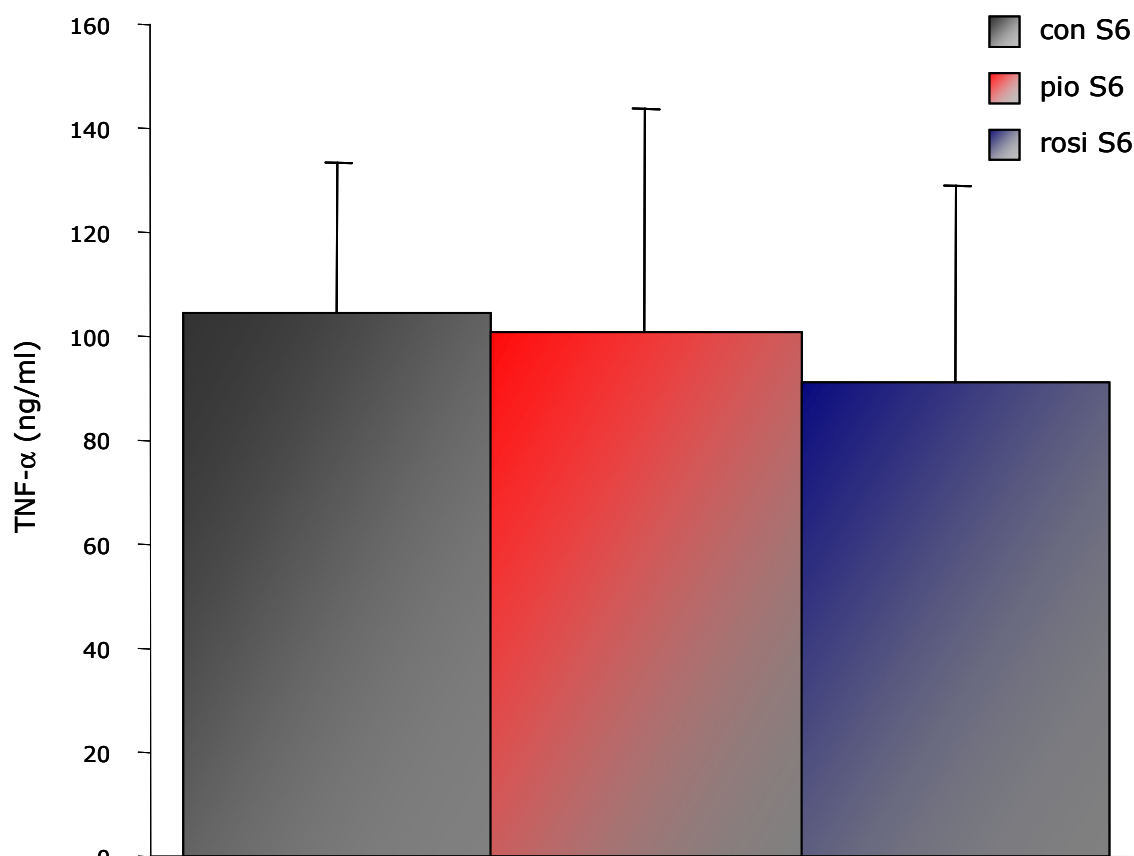


Figura 10. TNF- α . Niveles de TNF- α en plasma al final del tratamiento (S6). Grupos tratados con pioglitazona (pio, n=10) y rosiglitazona (rosi, n=8) comparados con el grupo control (con, n=7). Los valores están expresados como media \pm SD.

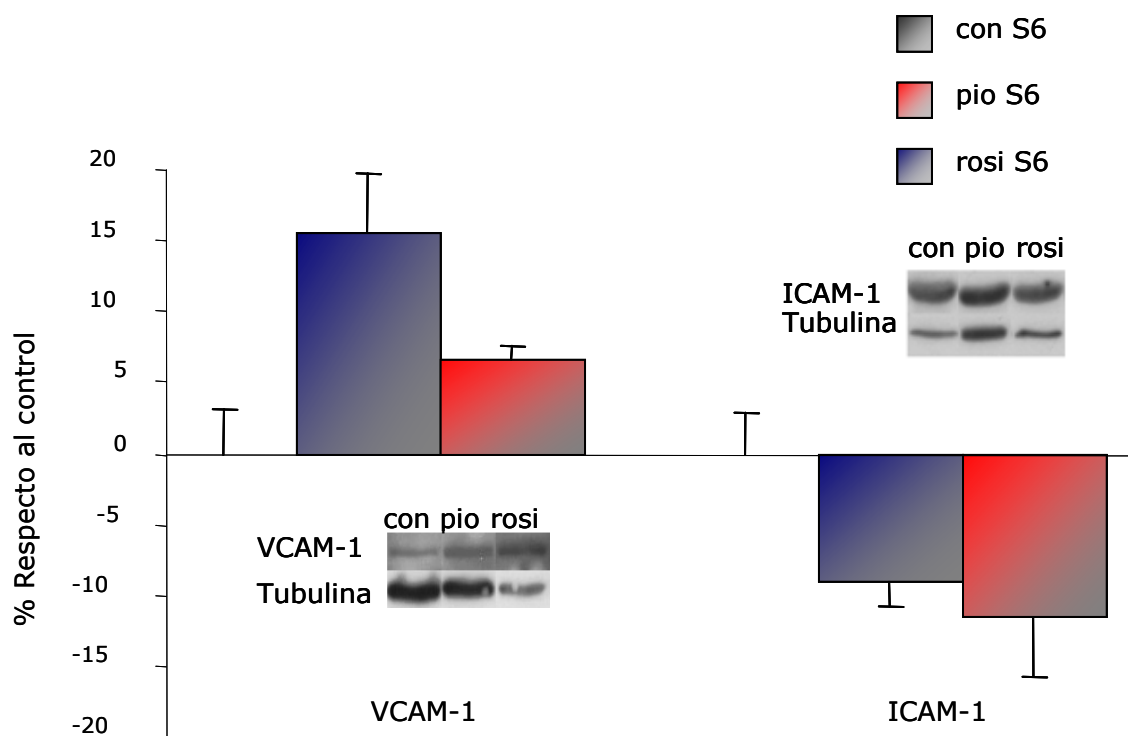


Figura 11. VCAM-1 e ICAM-1. Valores de VCAM-1 [V] e ICAM-1 [I] en aorta de los grupos tratados con pioglitazona (pio, n=7) y rosiglitazona (rosi, n=6[V], 7[I]) comparados con el grupo control (con, n=9) al final del tratamiento (S6). Los valores están expresados como media \pm SD.

5.4. Factor de transcripción kappa B (NF-κB)

El factor nuclear κB fue estudiado mediante EMSA en tejido adiposo visceral y músculo de corazón. Los valores en los grupos tratados no se modificaron con respecto al control ni en corazón (con: 1.00 ± 0.06 , pio: 0.84 ± 0.16 , rosi: 0.88 ± 0.14 u.a.) ni en tejido adiposo visceral (con: 1.00 ± 0.20 , pio: 0.83 ± 0.25 , rosi: 0.79 ± 0.16 u.a.) (Figura 12).

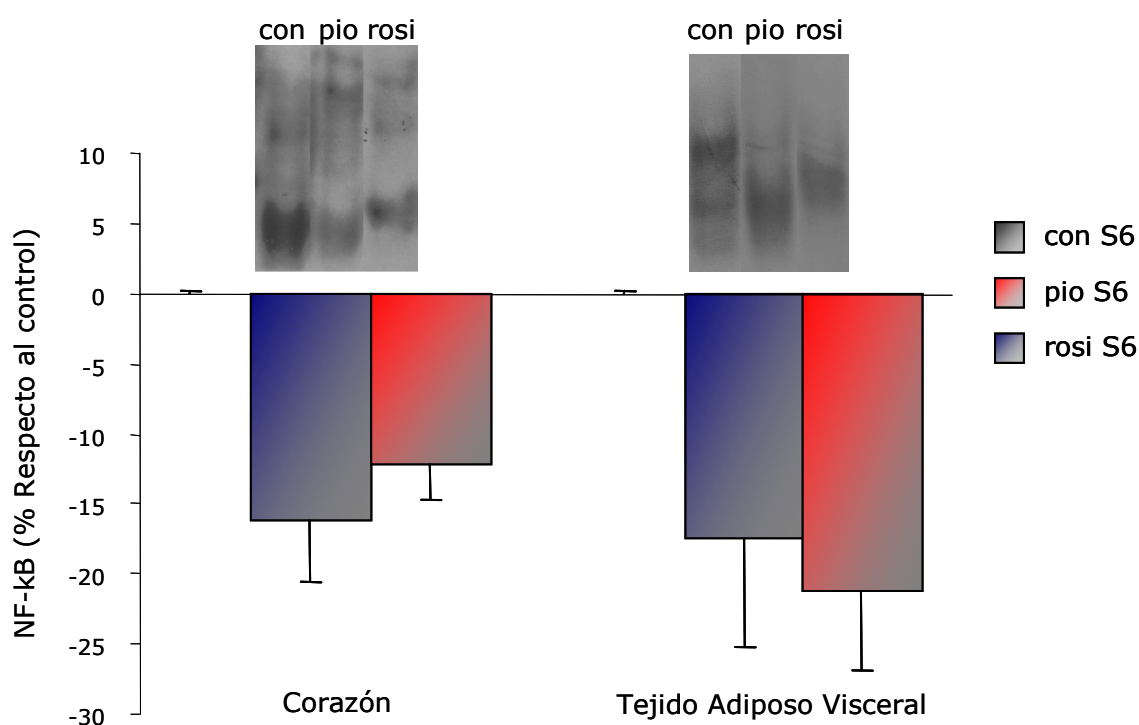


Figura 12. NF-κB. Contenido de NF-κB tejido muscular de corazón y en tejido adiposo visceral al final del tratamiento (S6). Grupos tratados con pioglitazona (pio, n=8) y rosiglitazona (rosi, n=7) comparados con el grupo control (con, n=7). Los valores están expresados como media \pm SD.

6. ADIPONECTINA

6.1. Identificación de las formas moleculares.

Los análisis de las formas moleculares de adiponectina se realizaron por la técnica de Western-Blot en condiciones no reductoras y no desnaturizantes. Al utilizar un anticuerpo policlonal lo primero que descartamos fue que el anticuerpo se uniera a otras proteínas que no fueran adiponectina, para lo que realizamos un Western-Blot en condiciones reductoras y desnaturizantes. Este análisis se llevó a cabo en muestras de

plasma tras tratamiento con pioglitazona. Como podemos ver en la figura 13A en estas condiciones el anticuerpo reconoce una sola proteína con un peso molecular de aproximadamente 30 kDa que corresponde al monómero de adiponectina.

Al realizar los experimentos en condiciones no reductoras y no desnaturalizantes encontramos resultados equiparables para plasma y tejido adiposo. Tanto en plasma como en tejido adiposo aparecen bandas con un peso molecular aproximado de 300 kDa que corresponden a la adpn-HMW y una banda ancha con un peso molecular de aproximadamente 180 kDa que corresponde a la adpn-MMW y que a veces se separaba en 2 con pesos aproximados de 180 kDa y 140 kDa (Figura 13B y C).

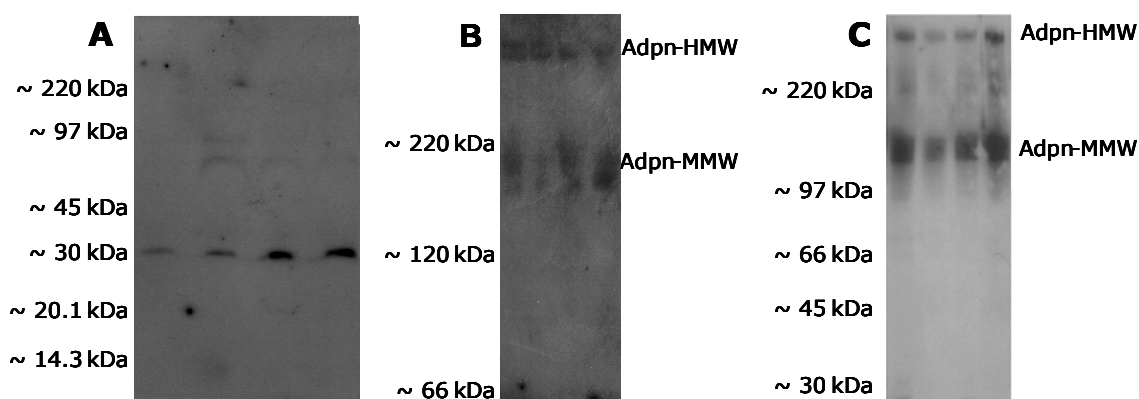


Figura 13. Western-Blot de adiponectina. A) Condiciones reductoras y desnaturalizantes. **B y C)** Condiciones no reductoras y no desnaturalizantes. **B)** Muestra de plasma. **C)** Muestra de tejido adiposo.

6.2. Adiponectina plasmática

6.2.1. Total

Al final de tratamiento, la adiponectina total en plasma, medida mediante ELISA, aumento en el grupo pioglitazona comparado con el grupo control (4.68 ± 0.76 vs 3.13 ± 0.63 $\mu\text{g/ml}$, $p < 0.05$) pero en el grupo rosiglitazona comparado con el grupo control (3.94 ± 0.74 vs 3.13 ± 0.63 $\mu\text{g/ml}$) (Figura 14).

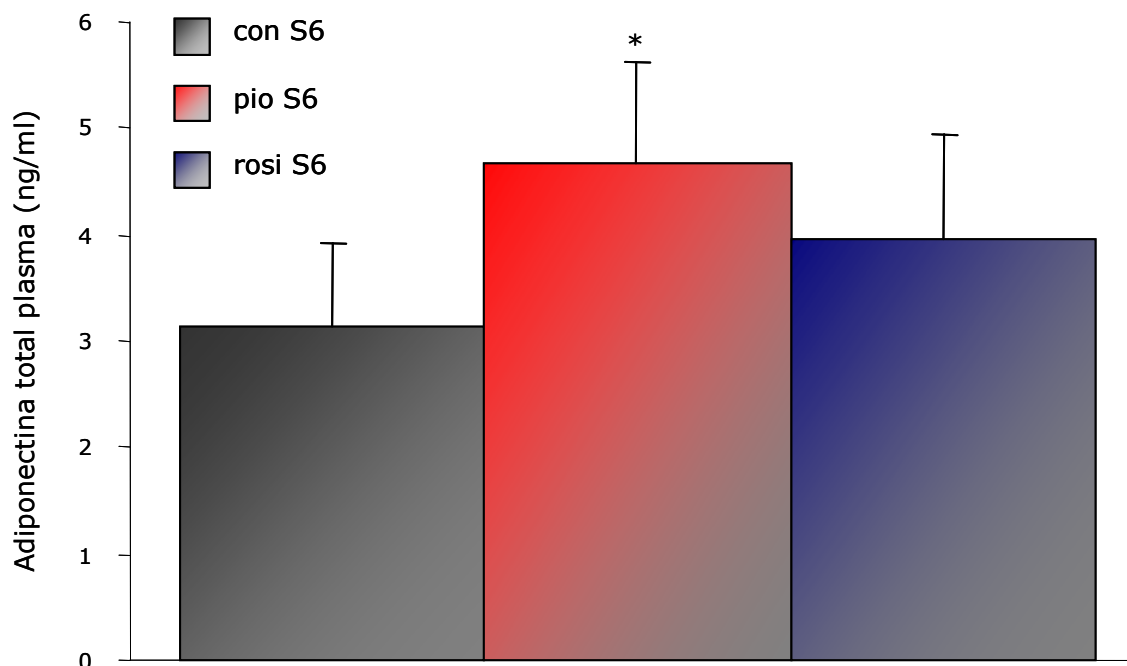


Figura 14. Adiponectina total. La adiponectina total fue medida al final del tratamiento (S6) en muestras de plasma obtenidas de sangre del corazón. La gráfica muestra los valores absolutos de adiponectina total de los grupos tratados con pioglitazona (pio, n=6) o rosiglitazona (rosi, n=7) comparados con el grupo control (con, n=6). Los valores están expresados como media \pm SD. *; $p < 0.05$.

6.2.2. Formas moleculares

El tratamiento con TZD's no produjo cambios significativos en el contenido total plasmático de las formas moleculares de adiponectina (Figura 15) pero si un cambio en la distribución de las formas moleculares. En el grupo control el porcentaje de adpn-HMW y adpn-MMW fue aproximadamente mismo (52.05 ± 5.84 vs 47.95 ± 5.84). En los grupos con tratamiento el porcentaje de adpn-HMW fue significativamente más alto, alcanzando a ser un 63% de la adiponectina total en el grupo pioglitazona y un 68% de la adiponectina total en el grupo rosiglitazona (Figura 16).

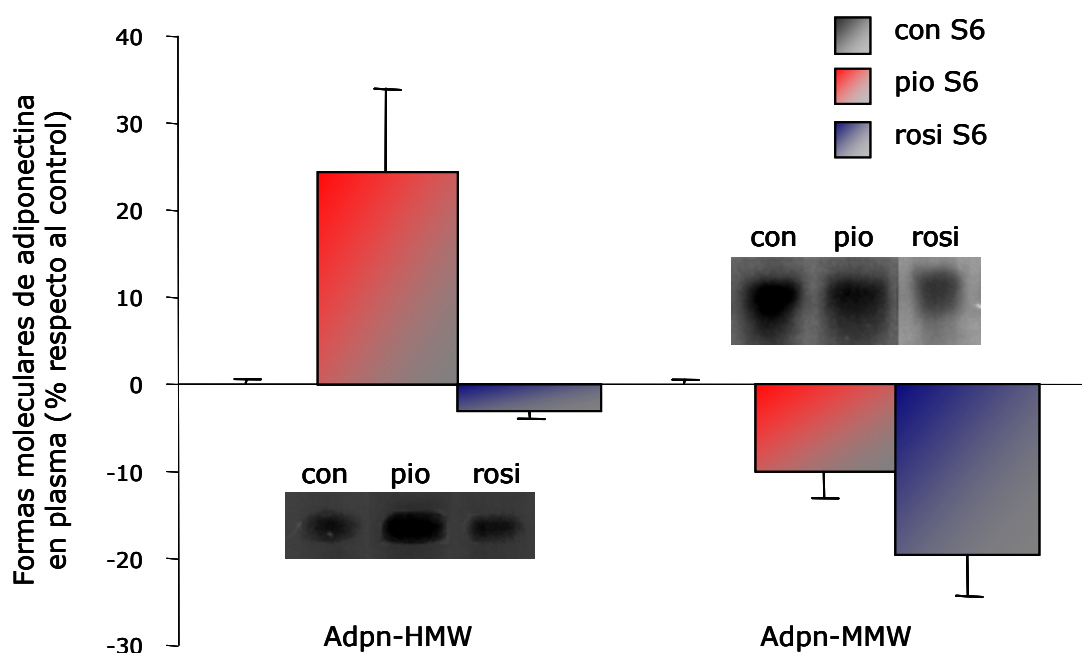


Figura 15. Formas moleculares de adiponectina. Efecto sobre las formas moleculares plasmáticas de adiponectina, Adpn-HMW [H] y Adpn-MMW [M], al final del tratamiento (S6). Tratamiento de pioglitazona (pio, n=10) o rosiglitazona (rosi, n=9) comparados con el grupo control (con, n=9). Los valores están expresados como media \pm SD.

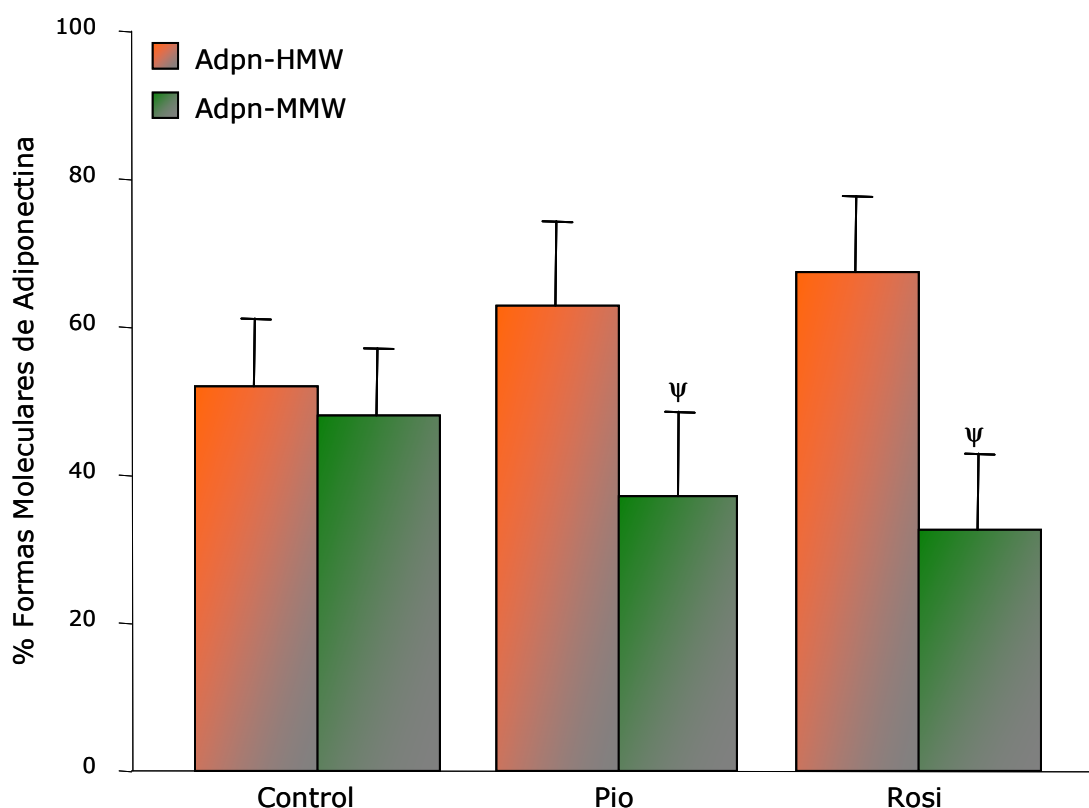


Figura 16. Formas moleculares de adiponectina. Distribución de adpn-HMW y adpn-MMW en muestras de plasma al final del tratamiento (S6) en los grupos control (n=9), pioglitazona (n=10) y rosiglitazona (n=9). Los resultados están expresados como media \pm SD. ψ ; $p < 0.001$.

El cambio en la distribución de las formas moleculares de adiponectina en plasma se refleja en el índice sensibilidad a adiponectina (S_A : $\text{adpn-HMW}/(\text{adpn-HMW}+\text{adpn-MMW})$). Tras el tratamiento con los dos fármacos, el índice S_A fue significativamente mas alto en estos dos grupos de tratamiento comparados con el grupo control (pio: 0.63 ± 0.08 , $p < 0.05$ y rosi: 0.68 ± 0.06 , $p < 0.01$ vs 0.52 ± 0.06 en el grupo control) (Figura 17).

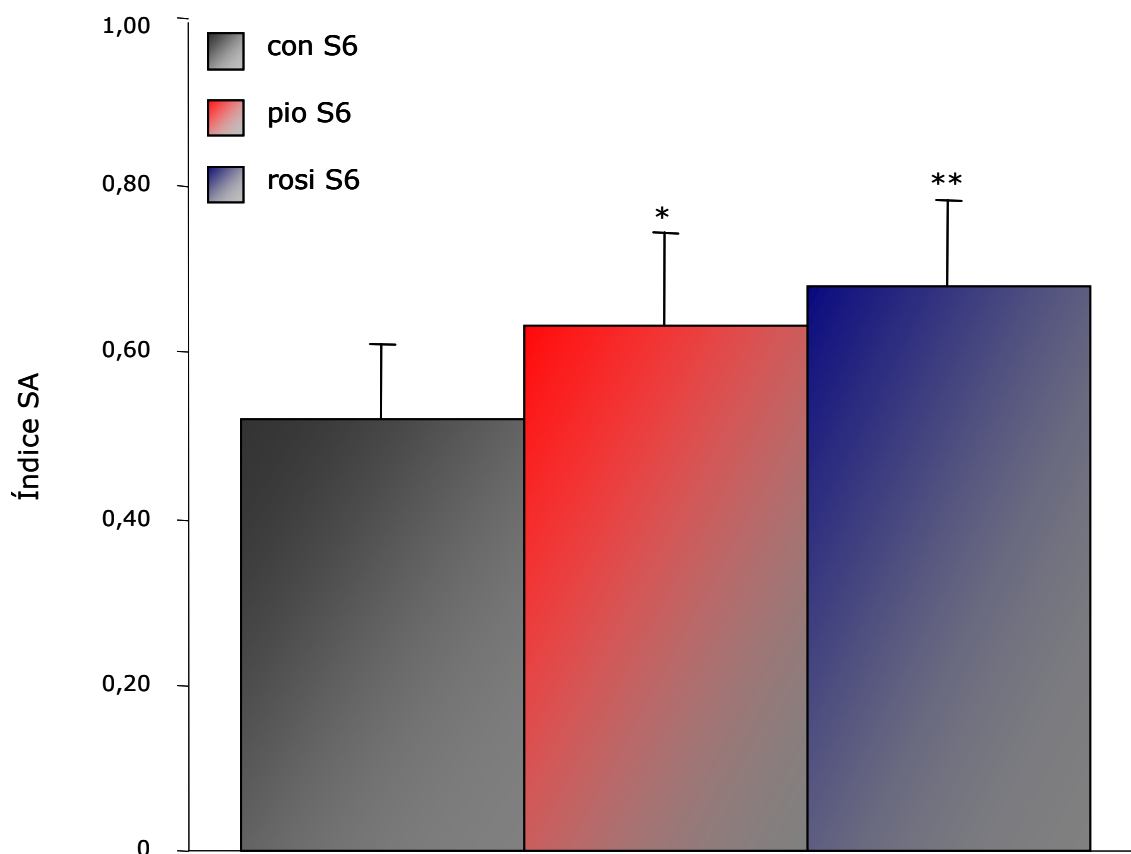


Figura 17. Formas moleculares de adiponectina. Efecto de pioglitazona (pio, $n=10$) y rosiglitazona (rosi, $n=9$) sobre el índice S_A en plasma al final del tratamiento comparado con el grupo control (con, $n=9$). Los resultados están expresados como media \pm SD. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$.

6.3. Adiponectina tisular: tejidos adiposos

6.3.1. Total

Igual que en plasma la adiponectina total fue cuantificada mediante ELISA. En el tejido adiposo visceral, no hubo diferencias significativas en el contenido total de adiponectina del grupo control (274.33 ± 67.29 ng/mg·prot) comparado con los grupos que recibieron tratamiento (pio: 334.84 ± 78.54 y rosi: 304.93 ± 76.95 ng/mg·prot). En el tejido adiposo

subcutáneo tampoco hubo diferencias entre el contenido de adiponectina total del grupo control (246.35 ± 50.78 ng/mg·prot) y el contenido total de adiponectina de los grupos con tratamiento (pio: 334.34 ± 68.80 y rosi: 265.28 ± 22.42 ng/mg·prot) (Figura 18).

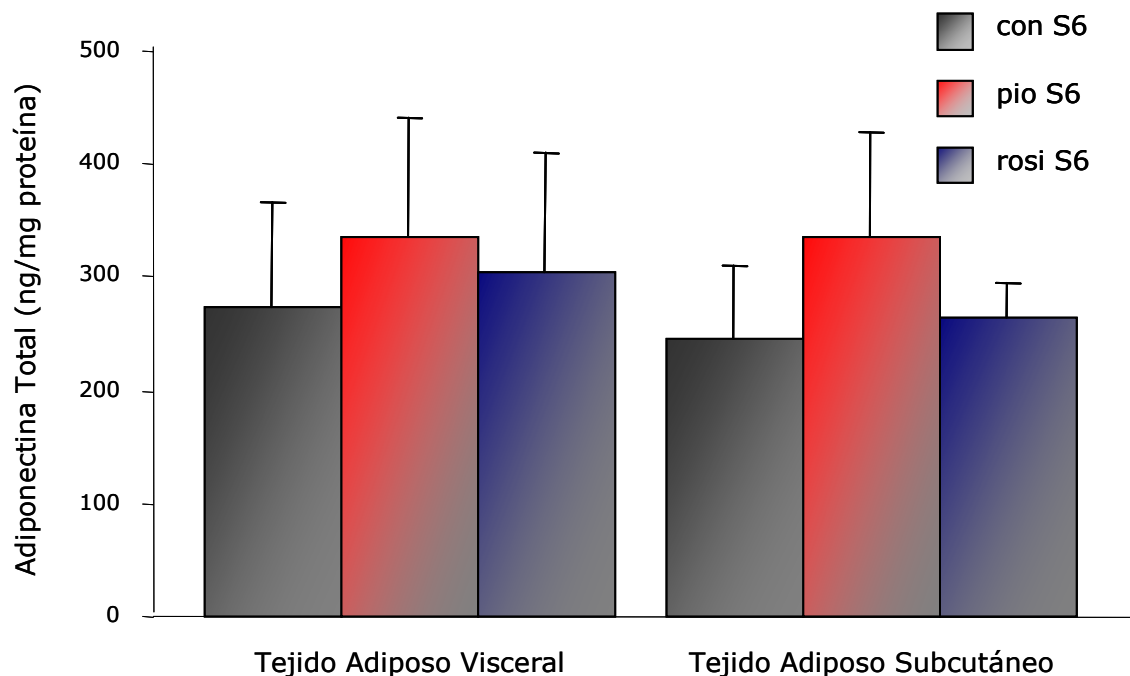


Figura 18. Adiponectina total. Contenido total de adiponectina en muestras de tejido adiposo visceral [v] y subcutáneo [s] al final del tratamiento (S6) en el grupo control (con, $n=7$ [v], 6[s]) y en los grupos con tratamiento de pioglitazona (pio, $n=7$) o rosiglitazona (rosi, $n=7$). Los resultados han sido expresados como media \pm SD.

6.3.2. Formas moleculares

La adpn-HMW aumentó en el grupo tratado con pioglitazona comparado con el control en el tejido adiposo visceral (1.31 ± 0.16 vs 1.00 ± 0.10 u.a., $p < 0.01$) pero no en el tejido adiposo subcutáneo (1.23 ± 0.14 vs 1.00 ± 0.08 u.a.). El contenido de adiponectina HMW en el tejido adiposo visceral también fue superior en el grupo pioglitazona comparado con el grupo rosiglitazona (1.31 ± 0.16 vs 1.02 ± 0.18 u.a., $p < 0.05$) (Figura 19).

La adpn-MMW no se modificó ni en el grupo pioglitazona ni en el grupo rosiglitazona comparado con el control en ninguno de los dos tejidos adiposos (TAV, con: 1.00 ± 0.13 , pio: 1.04 ± 0.37 , rosi: 1.06 ± 0.15 . TAS, con: 1.00 ± 0.11 , pio: 0.92 ± 0.32 , 1.83 ± 0.83) (Figura 19).

El porcentaje de adpn-HMW con respecto al de adpn-MMW tiende a aumentar en los dos tejidos adiposos con los dos tratamientos pero la distribución de las formas moleculares no varió en ninguno de los grupos de estudio ni en el tejido adiposo visceral (adpn-HMW vs adpn-MMW %, con: 52.07 vs 47.93, pio: 65.20 vs 34.80 y rosi: 59.53 vs 40.47), ni en el tejido adiposo subcutáneo (adpn-HMW vs adpn-MMW %, con: 44.36 vs 55.64, pio: 61.60 vs 38.40 y rosi: 50.40 vs 49.60).

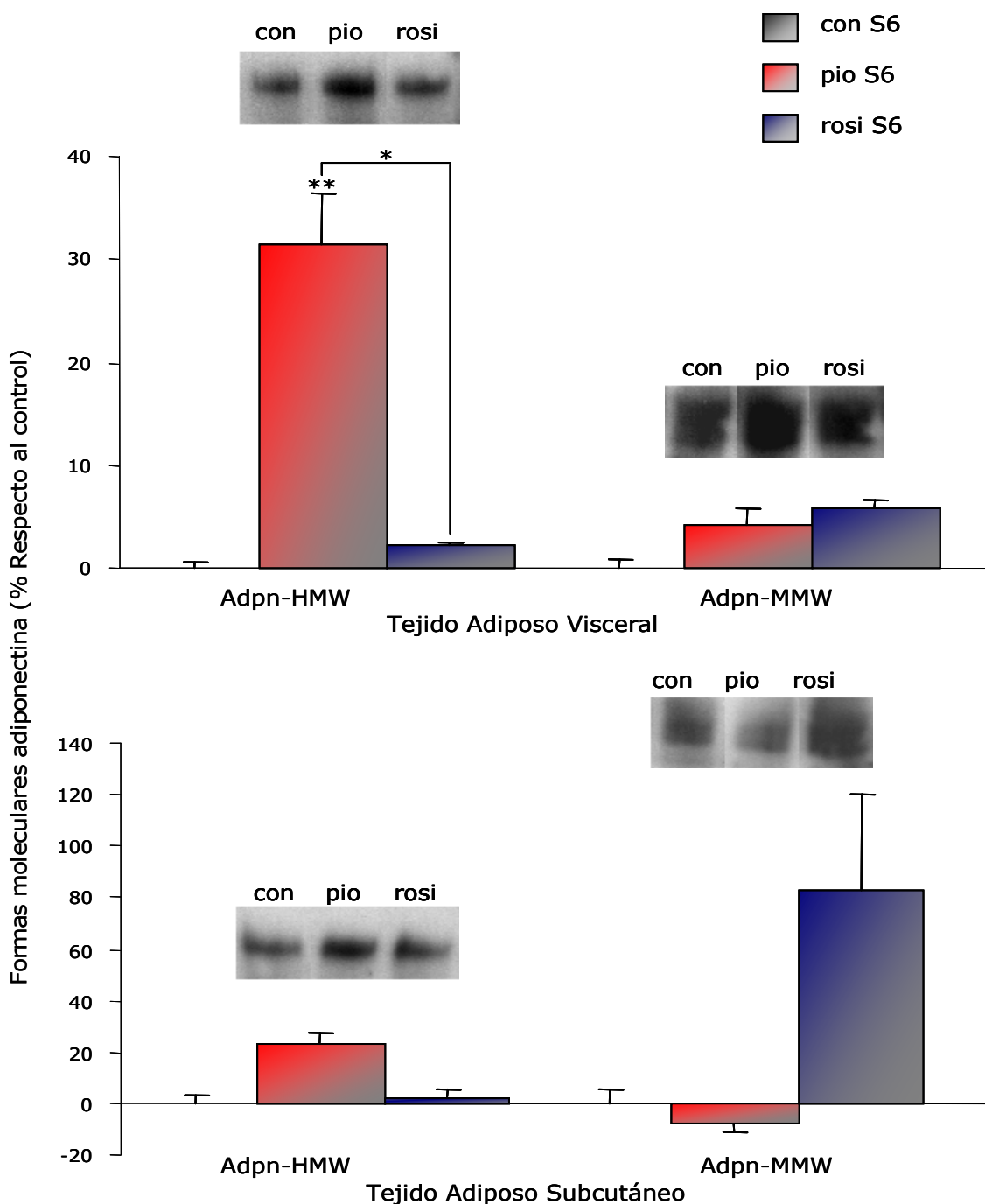


Figura 19. Formas moleculares de adiponectina. Efecto de la pioglitazona (pio, n=7) y la rosiglitazona (rosi, n=7) sobre las formas moleculares de adiponectina comparado con el grupo control (con, n=7). Valores expresados como media \pm SD. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.001$.

6.4. Expresión de adiponectina en el tejido adiposo.

La expresión de adiponectina en el tejido adiposo visceral no se vio modificada por ninguno de los dos tratamientos frente al grupo control (pio: 1.03 ± 0.22 u.a., rosi: 0.81 ± 0.22 u.a. vs 1.00 ± 0.12 u.a.) (Figura 20).

La expresión de adiponectina en tejido adiposo subcutáneo fue más alta en ambos grupos de tratamiento comparados con el control, solo alcanzando significancia en el grupo tratado con rosiglitazona comparado con el grupo control (pio: 1.33 ± 0.31 ($p=0.057$), rosi: 1.41 ± 0.25 ($p<0.05$) vs 1.00 ± 0.08 u.a.) (Figura 20).

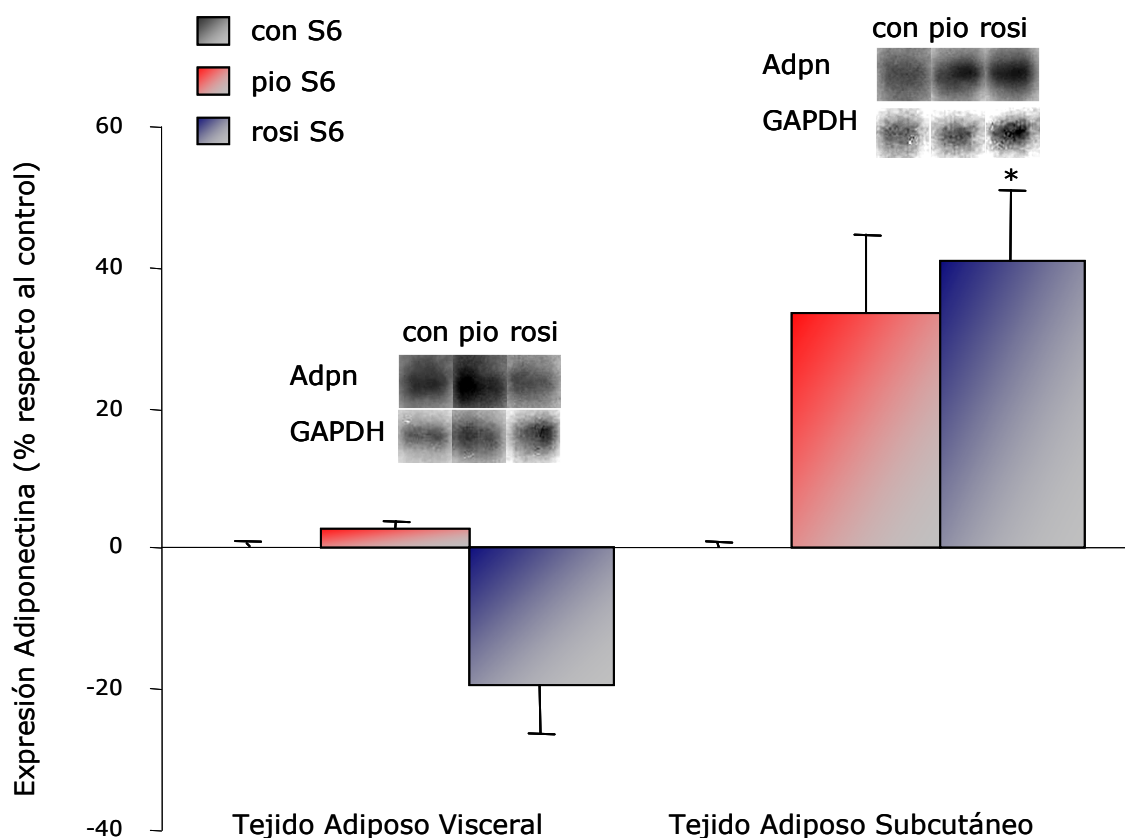


Figura 20. Expresión de adiponectina. Niveles de mRNA en muestras de los tejidos adiposos visceral y subcutáneo al final del tratamiento (S6). Grupos tratados con pioglitazona (pio, n=8) y rosiglitazona (rosi, n=7) comparados con el grupo control (con, n=7). Los valores están expresados como media \pm SD. *; $p<0.05$.

7. RECEPTORES DE ADIPONECTINA

7.1. Expresión de adipoR1

7.1.1. Músculo esquelético

La expresión del receptor de adiponectina adipoR1 en el músculo esquelético fue superior en los grupos con tratamiento (pio: 1.27 ± 0.20 , rosi: 1.49 ± 0.31 u.a.) comparados con el control (1.00 ± 0.14 u.a., $p < 0.05$) (Figura 21).

7.1.2. Hígado

La expresión de adipoR1 no se modificó en los grupos tratados con pioglitazona o rosiglitazona comparados con el control (pio: 0.88 ± 0.20 , rosi: 1.01 ± 0.18 , con: 1.00 ± 0.25 u.a.) (Figura 21).

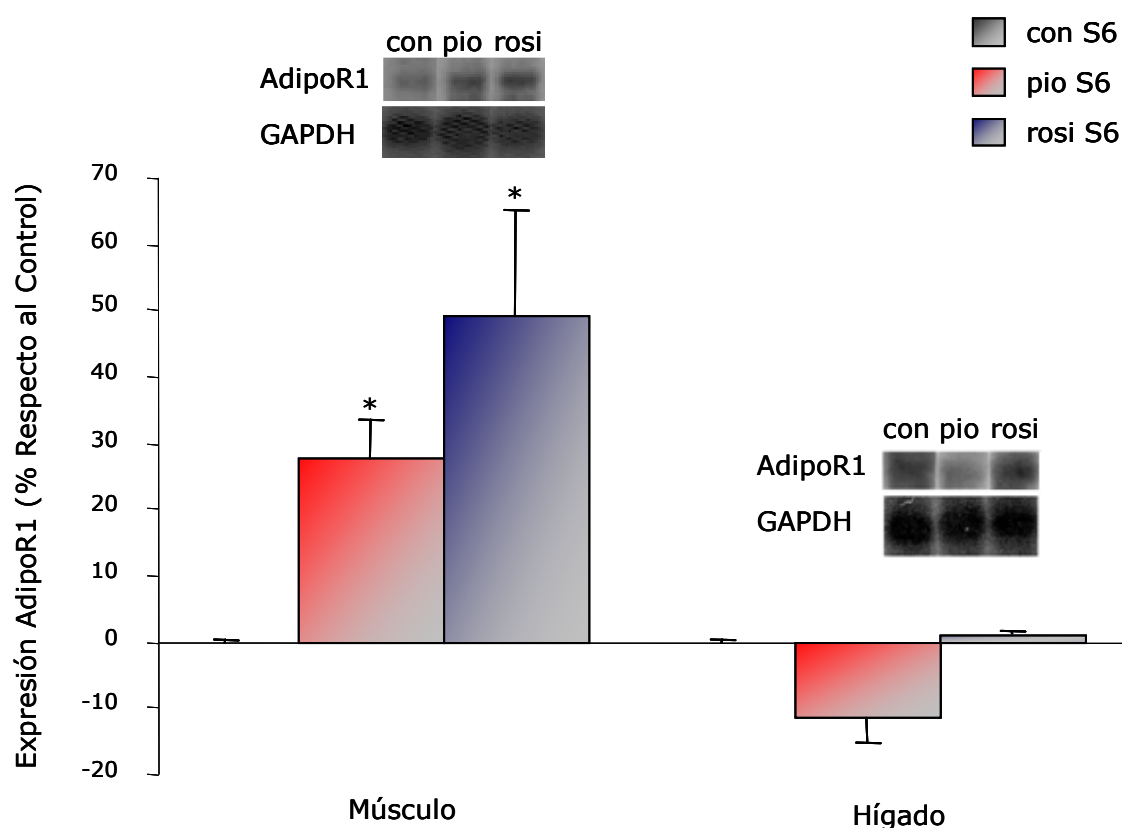


Figura 21. Expresión de adipoR1. Niveles de mRNA de adipoR1 en músculo [m] e hígado [h] en los grupos tratados con pioglitazona (pio, $n=8$ [m], 7 [h]) y rosiglitazona (ros, $n=10$ [m], 9 [h]) comparados con el grupo control (con, $n=9$ [m], 7 [h]). Valores expresados como media \pm SD *; $p < 0.05$.

7.2. Expresión adipoR2

7.2.1. Hígado

La expresión del receptor de adiponectina adipoR2 se encontró aumentada en ambos grupos de tratamiento comparados con el grupo control. En el grupo pioglitazona este aumento no llegó a ser significativo. En el grupo rosiglitazona, la expresión de adipoR2 además de aumentar respecto al grupo control, aumentó respecto al grupo pioglitazona (2.11 ± 0.29 vs 1.00 ± 0.12 (con), 1.24 ± 0.16 (pio) u.a., $p < 0.001$). (Figura 22).

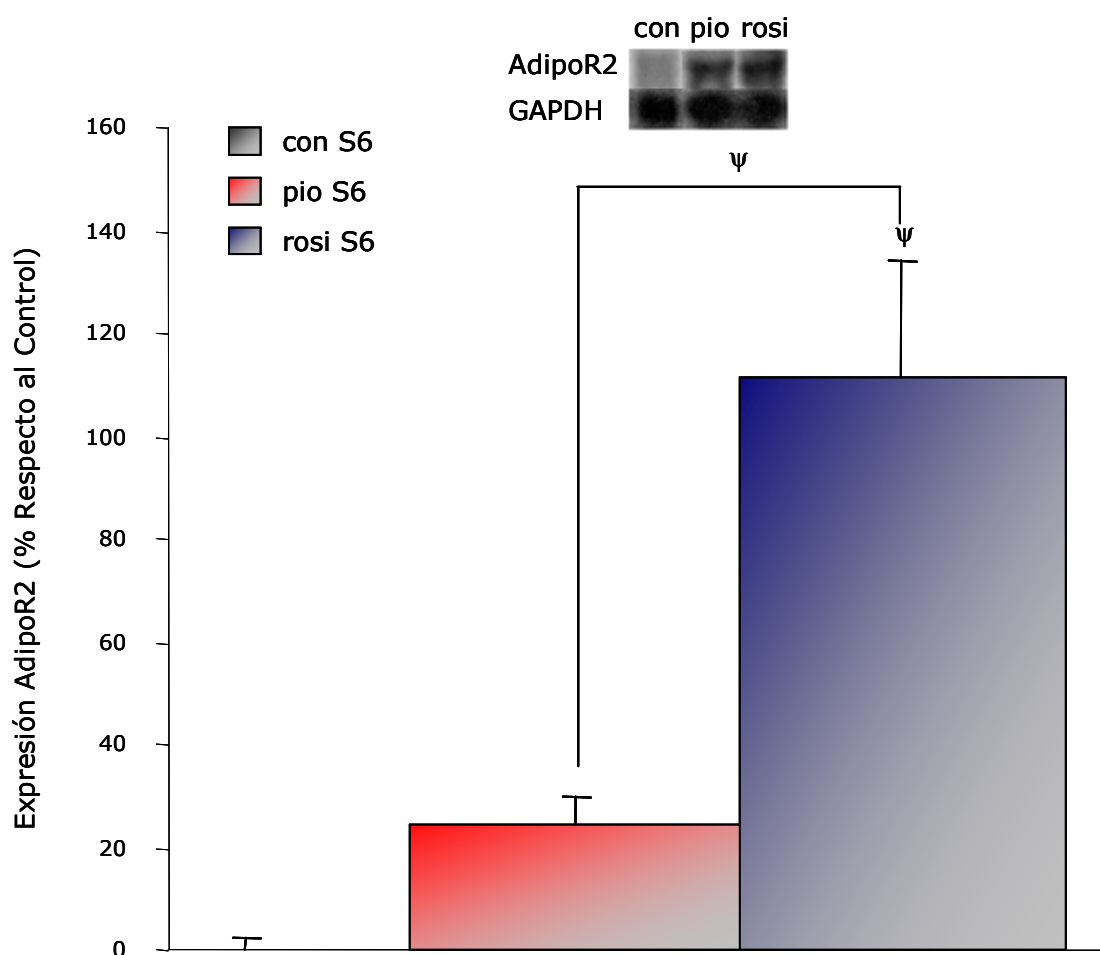


Figura 22. Expresión de adipoR2. Niveles de mRNA en el hígado de los grupos con tratamiento pioglitazona (pio, n=8) y rosiglitazona (rosi, n=8) comparados con el grupo control (con, n=8) al final del tratamiento (S6). Valores expresados como media \pm SD. ψ ; $p < 0.001$

8. CORRELACIONES

Al final del tratamiento, se realizó un estudio de correlaciones con el que se puede establecer que (Tabla 5):

Los resultados obtenidos en el índice de sensibilidad a insulina (HOMA) correlacionaron positivamente con los obtenidos en plasma para insulina y ácidos grasos y negativamente con el transporte de glucosa estimulado por insulina en músculo esquelético y la adiponectina total plasmática. Estas correlaciones son significativas en ambos grupos de tratamiento, luego se pueden atribuir al tratamiento con TZD's. En el grupo tratado con rosiglitazona, este índice además correlacionó positivamente con los niveles plasmáticos de adpn-MMW y negativamente con los niveles de ARNm de adipoR2 en hígado. En el tratamiento con pioglitazona también correlacionó negativamente con la adiponectina total de tejido adiposo visceral (TAV).

Por último, los niveles de ARNm de adipoR1 en músculo a pesar de no haber resultado significativos tras el tratamiento con tiazolidinedionas correlacionaron también con el índice HOMA.

El índice de sensibilidad a adiponectina (S_A) correlacionó positivamente en el grupo de pioglitazona con adpn-HMW plasmática y con los niveles proteicos de GLUT-4 en músculo esquelético. En el caso de rosiglitazona se dieron correlaciones negativas con los receptores de adiponectina, tanto de adipoR1 en músculo como de adipoR2 en hígado.

Tabla 5. Correlaciones. Resultado de los estudios de correlaciones entre los distintos parámetros realizados al finalizar el tratamiento.

Parámetro	HOMA						S_A			
	TZD's		Pioglitazona		Rosiglitazona		Pioglitazona		Rosiglitazona	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Insulina	0.970	<0.001	0.959	<0.001	0.976	<0.001				
A. Grasos	0.631	<0.05	0.732	<0.01	0.665	<0.01				
T. Glucosa	-0.831	<0.001	-0.848	<0.01	-0.860	<0.01				
Adpn Total (P)	-0.559	<0.05	-0.599	<0.05	-0.582	<0.05				
Adpn Total TAV			-0.547	<0.05						
AdipoR2 (Hig)					-0.720	<0.01			0.692	<0.05
AdipoR1 (Mus)	-0.452	<0.05							0.734	<0.01
Adpn-HMW (P)							0.748	<0.001		
GLUT-4 (Mus)							0.632	<0.01		

9. RESUMEN DE RESULTADOS

En la tabla 6 se muestra un resumen de los resultados obtenidos al final del tratamiento. La tabla refleja los cambios producidos en ambos grupos al final del tratamiento comparados con el grupo control.

Tabla 6. Resumen de resultados. Tabla recopilatoria de los resultados obtenidos al final de tratamiento.

Parámetro			Pioglitazona	Rosiglitazona
Peso			Igual	Aumenta
Glucosa			Igual	Igual
Insulina			Disminuye	Disminuye
Ácidos Grasos			Disminuye	Disminuye
HOMA			Disminuye	Disminuye
T. de Glucosa			Aumenta	Aumenta
GLUT-4			Aumenta	Aumenta
Marcadores Inflamatorios	TNF- α		Igual	Igual
	VCAM		Igual	Igual
	ICAM		Igual	Igual
	NF- κ B	TAV	Igual	Igual
		Corazón	Igual	Igual
Niveles/Contenido de Adiponectina	Plasma	Total	Aumenta	Igual
		Adpn-HMW	Igual	Igual
		Adpn-MMW	Igual	Igual
		S _A	Aumenta	Aumenta
	T. Adiposo Visceral	Total	Igual	Igual
		Adpn-HMW	Aumenta	Igual
		Adpn-MMW	Igual	Igual
	T. Adiposo Subcutáneo	Total	Igual	Igual
		Adpn-HMW	Igual	Igual
		Adpn-MMW	Igual	Igual
Niveles ARNm Adiponectina	T. adiposo visceral		Igual	Igual
	T. adiposo subcutáneo		Igual	Aumenta
Niveles ARNm receptores de Adiponectina	Músculo	AdipoR1	Aumenta	Aumenta
		AdipoR1	Igual	Igual
	Hígado	AdipoR2	Igual	Aumenta

DISCUSIÓN

Efecto insulinosensibilizador de las tiazolidinedionas

El modelo animal de las ratas zucker obesas (ob/ob) se caracteriza por presentar resistencia a la insulina y obesidad. Estos animales tienen niveles plasmáticos elevados de insulina y de ácidos grasos e intolerancia a la glucosa. Las tiazolidinedionas son fármacos utilizados en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, principalmente en individuos con sobrepeso, que se caracterizan por bajar los niveles sanguíneos de glucosa a través de la mejoría de la resistencia a la insulina en los tejidos periféricos.

El tratamiento de las ratas zucker obesas con las tiazolidinedionas pioglitazona y rosiglitazona (3 mg/kg·día) produjo una bajada de los niveles plasmáticos de insulina y de los ácidos grasos con respecto al grupo control. Si bien en estos animales los fármacos utilizados no modificaron los niveles de glucosa sanguínea, sí mejoraron la sensibilidad a la insulina medida mediante el índice HOMA. Al final del periodo de tratamiento, el índice HOMA disminuyó con respecto al grupo control un 43.4% en el grupo tratado pioglitazona y un 57.6% en el grupo tratado rosiglitazona.

El tratamiento con los dos fármacos induce en el hombre un aumento de peso de forma dosis dependiente (8). En nuestro estudio, al final del tratamiento se produjo un aumento significativo de peso en el grupo rosiglitazona comparado con respecto al grupo control.

Uno de los mecanismos principales por los que las glitazonas ejercen sus efectos antidiabéticos es aumentando la sensibilidad a la insulina en el músculo esquelético (107). Para analizar la mejoría que a este nivel pudieran tener los fármacos utilizados, hemos determinado el contenido del transportador de glucosa 4 (GLUT-4) en el músculo gastronemio y el transporte de glucosa estimulado por insulina en el músculo sóleo. En comparación con el grupo control, GLUT4 aumentó un 40% en las ratas tratadas con pioglitazona y un 111% en las tratadas con rosiglitazona. El incremento del transporte de glucosa inducido por insulina aumentó de forma similar tras el tratamiento con los dos fármacos, un 39% con pioglitazona y un 38% con rosiglitazona.

Una de las características de la obesidad, del síndrome metabólico y de la diabetes tipo 2 es la presencia de inflamación crónica que parece jugar un papel deletéreo en la acción de la insulina y en la función endotelial. En este sentido, se ha postulado que las glitazonas pueden tener un papel en la inhibición de los primeros estadios de la aterosclerosis mediante la modulación de los procesos inflamatorios. También, se ha referido que estos fármacos producen una disminución en la expresión de ARNm y niveles séricos de marcadores inflamatorios como pueden ser TNF- α (41), V-CAM-1 (27, 107), e ICAM-1 (82). En nuestro estudio hemos determinado los niveles plasmáticos de TNF- α y el contenido proteico de VCAM e ICAM en aorta. Además, hemos estudiado la activación del factor de necrosis nuclear kappa en el tejido adiposo visceral y en el músculo cardiaco. Este factor activa una cascada inflamatoria que parece que puede ser inhibida con el uso de tiazolidinedionas al menos en el tejido adiposo (21). Todos estos parámetros de inflamación estudiados no se modificaron en las ratas tratadas con las dos glitazonas en comparación con las ratas no tratadas. Si bien los estudios sobre estos fármacos (21) apuntan a un papel de los mismos en la mejoría de la inflamación asociada a la resistencia a la insulina, no parece que sea así en nuestro estudio con las dosis y tiempo de tratamiento utilizadas para ambas glitazonas.

Adiponectina y formas moleculares de adiponectina

Los resultados de nuestro proyecto apuntan a que la insulinosensibilización que producen las glitazonas se debe en alguna medida a la mejora de la acción de la insulina en el tejido muscular y en esta mejoría no parece estar mediada por una disminución del mediador inflamatorio TNF- α . El efecto producido por las glitazonas sobre la utilización de la glucosa en respuesta a insulina por el músculo esquelético parece ser, según han apuntado recientes estudios, un efecto secundario al papel de estos compuestos en el tejido adiposo (21). Las glitazonas activan los receptores PPAR- γ que se expresan fundamentalmente en el tejido adiposo donde producen: a) una estimulación de la actividad lipogénica en este tejido, lo que resulta, en una mayor supresión de la lipólisis dependiente de insulina (73) y b) un aumento de la adipogénesis que conlleva un mayor

almacenamiento de lípidos por los adipocitos de nueva generación. Como resultado, disminuyen los ácidos grasos libres circulantes y muy posiblemente se evita su infiltración en otros tejidos, principalmente el músculo y el hígado (74, 104).

Además, las glitazonas modifican la expresión de la mayor parte de las adipocinas (25, 34, 37, 38). Entre estas adipocinas, la modificación de adiponectina puede ser uno de los mecanismos a través de los cuales estos compuestos ejercen sus efectos en otros tejidos. Es conocido que la adiponectina activa la AMPK tanto en el músculo como en el hígado y en estos tejidos la cascada de señalización de esta proteína está implicada en el aumento del transporte de glucosa en el músculo y la disminución de la producción de glucosa por el hígado (49, 62, 87, 109) .

La relación de adiponectina total con estados de obesidad asociados o no a resistencia a insulina y/o DM2 se estableció inicialmente al describirse que los niveles totales plasmáticos de esta proteína eran mas bajos en estas situaciones (1, 3, 42, 45, 114). Posteriormente, se relacionaron estos estados con cambios en la distribución de las formas moleculares de adiponectina a nivel plasmático (6, 30, 36, 59, 80).

La adiponectina se puede presentar en varias formas moleculares (adpn-HMW, adpn-MMW, adpn-LMW y adiponectina globular). Utilizando la técnica de western-blot en condiciones no reductoras y no desnaturizantes hemos detectado que el modelo animal de las ratas zucker solo presenta adpn-HMW y adpn-MMW tanto en plasma como en los tejidos adiposos visceral y subcutáneo (Figura 11). Del mismo modo que Pajvani et al (79) que también describe la presencia de las formas moleculares de adiponectina de peso molecular alto y medio tanto en plasma humano como de ratón, no podemos descartar que con la técnica utilizada no se alcance suficiente sensibilidad para detectar concentraciones bajas de las otras formas moleculares.

La adiponectina total circulante aumentó en las ratas tratadas con glitazonas en comparación con las ratas no tratadas, pero este aumento sólo fue significativo en el tratamiento con pioglitazona. Por otra parte, el análisis de las distintas formas moleculares de adiponectina circulante no objetivó cambios significativos entre los grupos de ratas tratadas con los

fármacos y las ratas controles. Sin embargo, si se objetivó un cambio en la distribución de las diversas formas moleculares. Así, en ambos grupos de ratas tratadas aumenta la proporción de adpn-HMW pasando a representar un 63% y 68% del total de adiponectina en los grupos tratados con pioglitazona y con rosiglitazona, respectivamente, frente a un 52% en el grupo control.

La distribución de las formas moleculares de adiponectina circulante parece importante en cuanto a sus efectos sobre la resistencia a la insulina. Hasta el momento, se ha recalcado el papel central de adpn-HMW y los estudios se han centrado en conocer las variaciones de esta forma molecular en distintos estados y tras la administración de distintas sustancias. No sólo se ha postulado la importancia de la adpn-HMW, sino también la relación que guarda con las otras formas moleculares circulantes, parámetro que se calcula mediante el índice de sensibilidad a insulina S_A , resultado del cociente entre adpn-HMW y de adiponectina total (80).

El índice S_A no sólo es útil como marcador de resistencia a insulina, además, es mucho más sensible que los valores totales de adiponectina para determinar la mejoría de la sensibilidad a la insulina producida por TZD's, pudiendo discernir entre pacientes que aun teniendo un aumento de los niveles de adiponectina total no han sufrido una mejoría de la sensibilidad a insulina (80).

En nuestra investigación, los cambios producidos por las glitazonas en la distribución de las formas moleculares en plasma se traduce en cambios significativos del índice S_A , que aumenta significativamente respecto al grupo control un 21% en el grupo tratado con pioglitazona y un 31% en el grupo tratado con rosiglitazona. Este aumento del índice S_A observado en los dos tratamientos utilizados es debido a distintos "motivos". Así, en el grupo tratado con pioglitazona, la adpn-HMW tiende a subir, mientras que la adpn-MMW tiende a bajar y es la unión de estas dos tendencias la que hace que aumente el S_A . Por otra parte, en el grupo tratado con rosiglitazona, la adpn-HMW no se modifica mientras que adpn-MMW tiende a bajar y es esta bajada la que contribuye al aumento del S_A . Por tanto, queda claro que los aumentos significativos del S_A no son sólo atribuibles a

aumentos absolutos de adpn-HMW como hasta ahora se ha descrito en la mayoría de los estudios (36, 59, 80).

En distintas situaciones de resistencia a la insulina se ha descrito una bajada en los valores del índice S_A . Los estudios realizados en pacientes obesos indican la utilidad de la medición de las formas moleculares de adiponectina circulante y del cálculo del S_A . Un ejemplo es el trabajo realizado en niños obesos comparados con no obesos, y en niños obesos con síndrome metabólico comparados con niños obesos sin síndrome metabólico, en los que la disminución del S_A se asocia a una bajada selectiva de adpn-HMW (2). Otro ejemplo es el estudio realizado en pacientes obesos y con enfermedad coronaria, en los que la pérdida de peso se asocia a un aumento de la adiponectina total debido a un aumento de la adpn-HMW y a una disminución de las otras dos formas moleculares (56). Por otra parte, en pacientes diabéticos se ha descrito una bajada del índice S_A (80).

En el hombre y en modelos animales con estados de resistencia a la insulina se ha descrito que las tiazolidinedionas aumentan el S_A mediante cambios en la distribución de las formas moleculares de adiponectina. En sujetos con diabetes mellitus tipo 2, el tratamiento con glitazonas produce aumentos tanto de la adiponectina total como de adpn-HMW pero quien correlaciona más consistentemente con la mejoría de sensibilidad a insulina, sobre todo en hígado, es el índice S_A (80). En ratones ob/ob y db/db (80) los niveles de adiponectina total no siempre son más bajos en estados de menor sensibilidad a la insulina, pero, estos dos modelos animales si presentan una disminución en el porcentaje de adpn-HMW respecto a la adiponectina total. En estos animales la mejoría de la sensibilidad a la insulina producida por el tratamiento con tiazolidinedionas se asocia a un aumento del S_A que se atribuye a un aumento en adpn-HMW.

En estudios realizados in vitro, la pioglitazona aumenta la secreción de adpn-HMW por el tejido adiposo procedente de personas no diabéticas y de ratón. El aumento de secreción de adpn-HMW por pioglitazona también se ha observado en varias líneas celulares (3T3-F422A y células SGBS). En el tejido adiposo de sujetos no diabéticos se ha estudiado también el contenido del ARNm de adiponectina. De esta forma, el aumento de

secreción de adpn-HMW inducido por pioglitazona no se asoció a cambios en los niveles del ARNm de la adiponectina ni a cambios en la secreción de las otras formas moleculares, por lo que se considera que el efecto de la pioglitazona es a nivel posttranscripcional (13). Por otro lado, en sujetos con intolerancia a la glucosa, el tratamiento con pioglitazona tampoco aumenta el contenido del ARNm de adiponectina (86).

Con objeto de profundizar en el conocimiento de los efectos de las tiazolidinedionas sobre la expresión de adiponectina y la modulación de las formas moleculares de esta adipocina en el tejido adiposo, hemos realizado estudios en el tejido adiposo intra-abdominal o visceral y en el tejido adiposo subcutáneo. El tejido adiposo visceral es metabólicamente más activo y se le considera como uno de los contribuyentes más importantes en el desarrollo de la resistencia a la insulina.

En el tejido adiposo subcutáneo hay un aumento de expresión de la adiponectina de las ratas tratadas con respecto al grupo control. Este aumento de la expresión de adiponectina no se asocia con cambios en el contenido total de adiponectina total o de sus formas moleculares en ninguno de los grupos de ratas tratadas con los dos fármacos.

Sin embargo, en el tejido adiposo visceral de las ratas tratadas con pioglitazona a pesar de no haber cambios en la expresión de adiponectina si se observa un aumento de la adpn-HMW.

Los dos medicamentos en estudio aumentan el índice de S_A en plasma lo que parece ser un importante factor en la mejoría de sensibilidad a insulina producida por las glitazonas. En el tratamiento con rosiglitazona este cambio en la distribución de las formas moleculares en plasma no parece asociarse con cambios en la expresión o contenido de adiponectina y sus formas moleculares en ninguno de los dos tejidos adiposos estudiados. Sin embargo, en el grupo tratado con pioglitazona el cambio en la distribución plasmática de las formas moleculares de adiponectina coincide con aumentos de la adiponectina total plasmática y de la forma de alto peso molecular de adiponectina en el tejido adiposo visceral.

Receptores de adiponectina

La adiponectina ejerce sus efectos tras unirse a los receptores de membrana adipoR1 y adipoR2 presentes en sus tejidos diana. En nuestro estudio hemos analizado la expresión de estos receptores en el músculo esquelético y en el hígado. Estos dos tejidos son fundamentales en la homeostasis de la glucosa y en la acción de la insulina.

Se ha referido que en el modelo de rata Zucker obesa (fa/fa) la expresión de adipoR1 y adipoR2 en el tejido muscular y en el hígado no es distinta de la que presenta su comparador de rata delgada (11). Sin embargo, otros modelos animales de obesidad como el ratón obeso (ob/ob) presenta una expresión más baja de adipoR1 y adipoR2 en el músculo y en el hígado (102). El estudio de otros modelos de resistencia a la insulina y/o diabetes reportan datos dispares sobre la expresión de los receptores de adiponectina en músculo e hígado, por lo que muy posiblemente la expresión de estos receptores dependa de las causas de la resistencia a insulina y de la especie y modelo estudiado.

Se ha descrito que los agonistas PPAR- γ aumentan la expresión de adipoR2 y no modifican los niveles de expresión de adipoR1 en el hígado ni en otros tipos celulares como macrófagos o cardiomiocitos (26, 93). Sin embargo, el efecto de los agonistas PPAR- γ sobre la expresión de adipoR1 en el músculo no está tan claro.

El tratamiento de las ratas Zucker obesas con pioglitazona o rosiglitazona durante 6 semanas produjo un aumento en la expresión de adipoR1 en músculo y de adipoR2 en hígado en comparación con el grupo de ratas control. Los niveles de ARNm de adipoR1 en el hígado no se modificaron en las ratas tratadas con las tiazolidinedionas.

Los cambios en la expresión de los receptores de adiponectina fueron más acentuados tras el tratamiento con rosiglitazona. Con este fármaco, el aumento del ARNm de adipoR2 en el hígado fue un 111% respecto del valor en las ratas control, mientras que el tratamiento con pioglitazona indujo un aumento casi significativo ($p=0.058$) de un 24% respecto a las ratas control. En comparación con las ratas tratadas con pioglitazona, la

rosiglitazona produjo un aumento del ARNm de adipoR2 de un 70%. AdipoR1 no se modificó en este tejido con ninguno de los dos tratamientos.

El ARNm de adipoR1 del músculo de las ratas tratadas con rosiglitazona aumentó un 55% respecto al grupo control y las ratas tratadas con pioglitazona tuvieron un aumento de un 28% de la expresión de este receptor en el músculo en comparación con el grupo control.

Los resultados encontrados en el hígado donde hay un aumento de la expresión de adipoR2 en las ratas tratadas con rosiglitazona coinciden con los hallados por Sun et al (93) en la línea celular hepática humana HepG2 tratada con rosiglitazona (24h, 10 mM) y en hígado de ratones C57BL/6 tratados con rosiglitazona (30 mg/kg·día) durante 10 días. El menor efecto producido por pioglitazona sobre la expresión de adipoR2 en el hígado coincide con los resultados referidos por Inkuai et al (46) en ratones db/db tratados con pioglitazona (0.01% en dieta) durante 7 días.

Los estudios que han analizado el efecto de las tiazolidinedionas sobre la expresión del adipoR1 en el músculo no han dado resultados consistentes. Cabe recalcar aquí que este receptor se expresa fundamentalmente en el tejido muscular. Algunos estudios apuntan a una regulación positiva de adipoR1 en personas con DM2 tratadas con rosiglitazona (8 mg/día) durante 12 semanas (94). Sin embargo, también se ha referido la no estimulación del receptor adipoR1 por tiazolidinedionas en distintos estudios que contemplan sujetos diabéticos tipo 2 tratados con pioglitazona (45 mg/día) durante 21 días (60) o cultivos de miotúbulos de sujetos normales tratados con rosiglitazona (10 μ M) o troglitazona (0.1-1 μ M) durante 20 horas (52). Por último, se ha descrito un aumento no significativo de la expresión de adipoR1 en músculo de ratones db/db tratados con pioglitazona (0.01% (wt/wt)) durante 7 días.

Queda clara la falta de consistencia en los resultados de la expresión de adipoR1 en el músculo referida en los diferentes estudios. Algunas razones de la disparidad de los datos referidos pueden ser los distintos modelos de resistencia a la insulina estudiados, el fármaco y dosis empleadas, así como la duración de los tratamientos.

Se pueden barajar distintas hipótesis sobre el mecanismo por el cual las tiazolidinedionas aumentan la expresión de los receptores de adiponectina. Un mecanismo puede ser por un efecto directo de estos fármacos a través de sus receptores PPAR- γ presentes en el hígado y en el músculo esquelético. En contra de esta hipótesis está la escasa abundancia de estos receptores PPAR- γ en ambos tejidos. No obstante, se han referido estudios realizados en cultivos celulares que establecen una modulación directa de los PPAR- γ sobre los receptores de adiponectina (22, 26, 52, 93).

Otro mecanismo podría ser por un efecto regulador positivo de la adiponectina sobre sus propios receptores. En nuestro caso, este efecto se podría aplicar al tratamiento con pioglitazona que aumentó significativamente los niveles circulantes de esta adipocina, sin embargo, no podemos aplicarlo al tratamiento con rosiglitazona ya que no modificó significativamente los niveles plasmáticos de la adiponectina. Ahora bien, en nuestro estudio se comprobó que las ratas tratadas con rosiglitazona presentaron una correlación positiva entre el índice S_A y la expresión de adipoR2 en el hígado ($r = 0.734$, $p < 0.01$) y de adipoR1 en el músculo ($r = 0.692$, $p < 0.01$). Este resultado puede indicar que el balance positivo de la adpn-HMW ejerza un efecto regulador de la expresión de los receptores de adiponectina. Además, este mismo grupo de tratamiento presenta una correlación negativa entre la sensibilidad a insulina (HOMA) y la expresión de adipoR2 en el hígado ($r = -0.720$, $p < 0.01$).

Debido a las numerosas sustancias capaces de regular la expresión de los receptores de adiponectina, debemos considerar también que la mejoría de la sensibilidad a la insulina que experimentan las ratas tratadas con las glitazonas produzca una mayor expresión de los receptores de la adiponectina (15, 46).

En este estudio no hemos determinado la concentración de los receptores de adiponectina en el hígado ni en el músculo, por lo que no podemos deducir el significado biológico del efecto de las tiazolidinedionas sobre los cambios que producen en la expresión de los receptores de adiponectina en estos tejidos. No obstante, al menos en el grupo tratado con rosiglitazona, el hecho de que los niveles de ARNm de adipoR2 en el hígado y de adipoR1 en el músculo correlacionen con el índice S_A y que los

niveles de ARNm de adipoR2 en hígado correlacionen con el índice HOMA, podría indicar un papel de los receptores de adiponectina en el mecanismo de acción de las tiazolidinedionas.

CONCLUSIONES

1. El uso de tiazolidinedionas mejoran el perfil metabólico pero no el perfil inflamatorio en este modelo. El tratamiento mejora claramente los valores plasmáticos de insulina y ácidos grasos y además mejora la sensibilidad a insulina. Esta mejoría en los parámetros metabólicos no se asocia a mejoría en los parámetros de inflamación, posiblemente a causa de las dosis utilizadas y la duración del tratamiento.
2. Los cambios de S_A en plasma no se deben exclusivamente a cambios en adpn-HMW, pequeños cambios de las formas moleculares adpn-HMW y adpn-MMW pueden también modificar S_A .
3. Pioglitazona y rosiglitazona podrían ejercer parte de sus efectos insulino sensibilizadores a través de la adiponectina. De ser así, lo hacen aparentemente de forma distinta. En el grupo tratado con pioglitazona los cambios más evidentes son sobre la adiponectina en sí, a nivel de tejido adiposo visceral y de plasma. En el grupo rosiglitazona, los efectos producidos por este medicamento son más evidentes a nivel de los receptores de adiponectina.
4. Pioglitazona y rosiglitazona estimulan la expresión de adipoR1 en músculo esquelético al menos en este modelo de obesidad y resistencia a insulina. A nivel de hígado no está claro como modulan las glitazonas los receptores de adiponectina y parece que puede depender de la especie y de las causas de la resistencia a insulina. En este modelo ambas glitazonas estimulan positivamente la expresión de adipoR2, receptor mayoritario en este tejido.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin T, Hayden J, Reaven GM, Reaven PD.** Discrimination between obesity and insulin resistance in the relationship with adiponectin. *Diabetes* 53: 585-590, 2004.
2. **Araki S, Dobashi K, Kubo K, Asayama K, Shirahata A.** High molecular weight, rather than total, adiponectin levels better reflect metabolic abnormalities associated with childhood obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 5113-5116, 2006.
3. **Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y.** Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Com* 257: 79-83, 1999.
4. **Barbu A, Persdotter-Hedlund G, Lind J, Carlsson C.** Pref-1 and adipokine expression in adipose tissues of GK and Zucker rats. *Mol Cell Endocrinol* 299: 163-171, 2009.
5. **Barzilai N, She L, Liu BQ, Vuguin P, Cohen P, Wang J, Rossetti L.** Surgical removal of visceral fat reverses hepatic insulin resistance. *Diabetes* 45: 94-98, 1999.
6. **Basu R, Pajvani UB, Rizza RA, Scherer PE.** Selective downregulation of the high molecular weight form of adiponectin in hyperinsulinemia and in type 2 diabetes: differential regulation from nondiabetic subjects. *Diabetes* 56: 2174-2177, 2007.
7. **Bauche IB, Ait El, Mkadem S, Rezsohazy R, Funahashi T, Maeda N, Miranda LM, Brichard SM.** Adiponectin downregulates its own production and the expression of its AdipoR2 receptor in transgenic mice. *Biochem Biophys Res Comm* 345: 1414-1424, 2006.
8. **Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA.** Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferators-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 463-478, 2004.
9. **Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE.** The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7: 947-953, 2001.
10. **Berg AH, Combs TP, Scherer PE.** ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13: 84-89, 2002.
11. **Beylot M, Pineur C, Peroni O.** Expression of the adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 in lean rats and obese Zucker rats. *Metabolism* 55: 396-401, 2006.
12. **Bjursell M, Ahnmark A, Bohlooly-Y M, William-Olsson L, Rhedin M, Peng XR, Ploj K, Gerdin AK, Arnerup G, Elmgren A, Berg AL, Oscarsson J, Lindén D.** Opposing effects of adiponectin receptors 1 and 2 on energy metabolism. *Diabetes* 56: 583-593, 2007.
13. **Bodles AM, Banga A, Rasuoli N, Fumiyo O, Kern PA, Owens RJ.** Pioglitazone increases secretion of high-molecular-weight adiponectin from adipocyte. *J Physiol Endocrinol Metab* 291: E1100-1105, 2006.
14. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 7: 248-254, 1976.
15. **Civitarese AE, Jenkinson CP, Richardson D, Bajaj M, Cusi K, Kashyap S, Berria R, Belfort R, DeFronzo RA, Mandarino LJ, Ravussin E.** Adiponectin receptors gene expression and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican. *Diabetologia* 47: 816-820, 2004.
16. **Civitarese AE, Ukropcova B, Carling S, Hulver M, DeFronzo RA, Mandarino L, Ravussin E, Smith SR.** Role of adiponectin in human skeletal muscle bioenergetics. *Cell Metab* 4: 75-87, 2006.
17. **Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ, Retzlaff BM, Knopp RH, Brunzell JD, Kahn SE.** Relationship of adiponectin to

body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidences for independent roles of age and sex. *Diabetologia* 46: 459-469, 2003.

18. **Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L.** Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 108: 1875-1881, 2001.

19. **Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez-Chillaron JC, Patti ME, Klein SL, Weinstein RS, Scherer PE.** Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* 52: 268-276, 2005.

20. **Combs TP, Pajvani UB, Berg AH, Lin Y, Jelicks LA, Laplante M, Nawrocki AR, Rajala MW, Parlow AF, Cheeseboro L, Ding YY, Russell RG, Lindemann D, Hartley A, Baker GR, Obici S, Deshaies Y, Ludgate M, Rossetti L, Scherer PE.** A Transgenic Mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. *Endocrinology* 145: 367-383, 2004.

21. **Chiarelli F, Di Marzio D.** Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists and diabetes: Current evidence and future perspectives. *Vasc Health Risk Manag* 4: 297-304, 2008.

22. **Chinetti G, Zawadzki C, Fruchart J, Staels B.** Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonist of the nuclear receptors PPAR alpha, PPAR gamma and LXR. *Biochem Biophys Res Comm* 314: 51-58, 2004.

23. **Chua Jr SC, White DW, Wu-Peng XS, Liu SM, Okada M, Kershaw E.E, Chung WK, Power-Kehoe L, Chua M, Tartaglia LA, Leibel RL.** Phenotype of fatty due to Gln269Pro mutation in the leptin receptor (Lepr). *Diabetes* 45: 1141-1143, 1996.

24. **Debard C, Laville M, Berbe V, Loizon E, Guillet C, Morio-Liondore B, Boirie Y, Vidal H.** Expression of key genes of fatty acid oxidation, including adiponectin receptors, in human skeletal muscle of type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 47: 917-925, 2004.

25. **Di Gregorio GB, Yao-Borengasser A, Rasouli N, Varma V, Lu T, Miles LM, Ranganathan G, Peterson CA, McGehee RE, Kern PA.** Expression of CD68 and macrophage chemoattractant protein-1 genes in human adipose and muscle tissues: association with cytokine expression, insulin resistance, and reduction by pioglitazone. *Diabetes* 54: 2305-2313, 2005.

26. **Ding G, Qin Q, He N, Francis-David S.C, Hou J, Liu J, Ricks E, Yang Q.** Adiponectin and its receptors are expressed in adult ventricular cardiomyocytes and upregulated by activation of peroxisome proliferators-activated receptor γ . *J Mol Cell Cardiol* 43: 73-84, 2007.

27. **Dolezalova R, Halizik MM, Bosanska L, Lacinova A, Kasalova Z, Stulc T, Haluzik M.** Effect of PPAR-gamma agonist treatment on markers of endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus. *Physiol Res* 56: 741-748, 2006.

28. **Ebinuma H, Miyazaki O, Yago H, Hara K, Yamauchi T, Kadowaki T.** A novel ELISA system for selective measurement of human adiponectin multimers by using proteases. *Clin Chim Acta* 372: 47-53, 2006.

29. **Fasshauer M, Klein J, Kralisch S, Klier M, Lössner U, Blüher M, Paschke R.** Growth hormone is a positive regulator of adiponectin receptor 2 in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 558: 27-32, 2004.

30. **Fisher FF, Trujillo ME, Hanif W, Barnett AH, McTernan PG, Scherer PE, Kumar S.** Serum high molecular weight complex of adiponectin correlates better with glucose tolerance than total serum adiponectin in Indo-Asian males. *Diabetologia* 48: 1084-1087, 2005.

31. **Frias JP, Macaraeg GB, Ofrecio J, Yu JG, Olefsky JM, Kruszynska YT.** Decreased susceptibility to fatty acid-induced peripheral tissue insulin resistance in women. *Diabetes* 50: 1344-1350, 2001.

32. **Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF.** Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte

complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2005-2010, 2001.

33. **Grundy SM, Brewer Jr HB, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lefant C; American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute.** Definition of metabolic Syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute / American Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 109: 433-438, 2004.

34. **Hammarstedt A, Andersson CX, Rotter Sopasakis V, Smith U.** The effect of PPARgamma ligands on the adipose tissue in insulin resistance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73: 65-75, 2005.

35. **Hara K, Boutin P, Mori Y, Tobe K, Dina C, Yasuda K, Yamauchi T, Otabe S, Okada T, Eto K, Kadowaki H, Hagura R, Akanuma Y, Yazaki Y, Nagai R, Taniyama M, Matsubara K, Yoda M, Nakano Y, Tomita M, Kimura S, Ito C, Froguel P, Kadowaki T.** Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* 51: 536-540, 2002.

36. **Hara K, Horikoshi M, Yamauchi T, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, Imai Y, Nagai R, Kadowaki T.** Measurement of the high-molecular weight form of adiponectin in plasma is useful for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome. *Diabetes Care* 29: 1357-1362, 2006.

37. **Harte A, McTernan P, Chetty R, Coppack S, Katz J, Smith S, Kumar S.** Insulin-mediated upregulation of the renin angiotensin system in human subcutaneous adipocytes is reduced by rosiglitazone. *Circulation* 111: 1954-1961, 2005.

38. **Harte AL, McTernan PG, McTernan CL, Smith SA, Barnett AH, Kumar.** Rosiglitazone inhibits the insulin-mediated increase in PAI-1 secretion in human abdominal subcutaneous adipocytes. *Diabetes Obes Metab* 5: 302-310, 2003.

39. **He W, Barak Y, Hevener A, Olson P, Liao D, Le J, Nelson M, Ong E, Olefsky JM, Evans RM.** Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15712-15717, 2003.

40. **Hevener AL, He W, Barak Y, Le J, Bandyopadhyay G, Olson P, Wilkes J, Evans RM, Olefsky J.** Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. *Nat Med* 9: 1491-1497, 2003.

41. **Hofmann C, Lorenz K, Braithwaite SS, Colca JR, Palazuk BJ, Hotamisligil GS, Spiegelman BM.** Altered gene expression for tumor necrosis factor-alpha and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. *Endocrinology* 134: 264-270, 1994.

42. **Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y.** Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1595-1599, 2000.

43. **Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeyer HK, Arita Y, Hansen BC, Matsuzawa Y.** Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 50: 1126-1133, 2001.

44. **Hotta K, Matsuzawa Y.** Molecular mechanism in the development of the complications associated with obesity - the physiological and pathological role of adipocytokines. *Nippon Rinsho*: 481-486, 2001.

45. **Hu E, Liang P, Spiegelman BM.** AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271: 10697-10703, 1996.

46. **Inukai K, Nakashima Y, Watanabe M, Takata N, Sawa T, Kurihara S, Awata T, Katayama S.** Regulation of adiponectin receptor gene expression in diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E876-882, 2005.

47. **Kadowaki T, Yamauchi T.** Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrin Rev* 26: 439-451, 2005.
48. **Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K.** Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 116: 1784-1792, 2006.
49. **Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG.** AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1: 15-25, 2004.
50. **Kahn BB, Flier JS.** Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 106: 473-481, 2000.
51. **Kalin MF, Zumoff B.** Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies. *Steroids* 55: 330-352, 1990.
52. **Kaltenbach S, Staiger H, Weisser M, Haas C, Stumvoll M, Machicao F, Häring HU.** Adiponectin receptor gene expression in human skeletal muscle cells is not regulated by fibrates and thiazolidinediones. *Int J Obes Relat Metab Disord* 29: 760-765, 2005.
53. **Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G.** Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin-resistance and TNF alpha expression. *Diabetes* 52: 1779-1785, 2003.
54. **Kharroubi I, Rasschaert J, Eizirik DL, Cnop M.** Expression of adiponectin receptors in pancreatic β cells. *Biochem Biophys Res Comm* 312: 118-122, 2004.
55. **Kobashi C, Urakaze M, Kishida M, Kibayashi E, Kobayashi H, Kihara S, Funahashi T, Takata M, Temaru R, Sato A, Yamazaki K, Nakamura N, Kobayashi M.** Adiponectin inhibits endothelial synthesis of interleukin-8. *Circ Res* 97: 1245-1252, 2005.
56. **Kobayashi H, Ouchi N, Kihara S, Walsh K, Kumada M, Abe Y, Funahashi T, Matsuzawa Y.** Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circ Res* 94: e27-31, 2004.
57. **Koerner A, Kratzsch J, Kiess W.** Adipocytokines: leptin—the classical, resistin—the controversial, adiponectin—the promising, and more to come. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19: 525-546, 2005.
58. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
59. **Lara-Castro C, Luo N, Wallace P, Klein RL, Garvey WT.** Adiponectin multimeric complexes and the metabolic syndrome trait cluster. *Diabetes* 55: 249-259, 2006.
60. **Li W, Tonelli J, Kishore P, Owen R, Goodman E, Scherer PE, Hawkins M.** Insulin-sensitizing effects of thiazolidinediones are not linked to adiponectin receptor expression in human fat or muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E1301-1307, 2007.
61. **Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, Knowler WC, Krakoff J.** Adiponectin and development of type 2 diabetes in the pima indian population. *Lancet* 360: 57-58, 2002.
62. **Lochhead P, Salt IP, Walker KS, Hardie DG, Sutherland C.** 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes* 49: 896-903, 2000.
63. **Macor C, Ruggeri A, Mazzonetto P, Federspil G, Cobelli C, Vettor R.** Visceral adipose tissue impairs insulin secretion and insulin sensitivity but not energy expenditure in obesity. *Metabolism* 46: 123-129, 1997.
64. **Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K.** cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Com* 221: 286-289, 1996.
65. **Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T,**

- Matsuzawa Y.** Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *2002* 8: 731-737, 2002.
66. **Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y.** PPAR-gamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 50: 2094-2099, 2001.
67. **Menzaghi C, Trischitta V, Doria A.** Genetic influences of adiponectin on insulin resistance, type 2 Diabetes, and cardiovascular disease. *Diabetes* 56: 1198-1208, 2007.
68. **Metais C, Forcheron F, Abdallah P, Basset A, Del Carmine P, Bricca G, Beylot M.** Adiponectin receptors: expression in Zucker diabetic rats and effects of fenofibrate and metformin. *Metabolism* 57: 946-953, 2008.
69. **Motoshima H, Wu X, Sinha MK, Hardy VE, Rosato EL, Barbot DJ, Rosato FE, Goldstein BJ.** Differential regulation of adiponectin secretion from cultured human omental and subcutaneous adipocytes: Effects of insulin and rosiglitazone. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 5662-5667, 2002.
70. **Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M.** Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem* 120: 803-812, 1996.
71. **Nawrocki AR, Rajala MW, Tomas E, Pajvani UB, Saha AK, Trumbauer ME, Pang Z, Chen AS, Ruderman NB, Chen H, Rossetti L, Scherer PE.** Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem* 281: 2654-2660, 2006.
72. **Norris AW, Chen L, Fisher SJ, Szanto I, Ristow M, Jozsi AC, Hirshman MF, Rosen ED, Goodyear LJ, Gonzalez FJ, Spiegelman BM, Kahn CR.** Muscle-specific PPAR-gamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but responses to thiazolidinediones. *J Clin Invest* 112: 608-618, 2003.
73. **Oakes ND, Thalén PG, Jacinto SM, Ljung B.** Thiazolidinediones increase plasma adipose tissue FFA exchange capacity and enhance insulin-mediated control of systemic FFA availability. *diabetes* 50: 1158-1165, 2001.
74. **Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T.** Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest* 101: 1354-1361, 1998.
75. **Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y.** Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100: 2473-2476, 1999.
76. **Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, Ishigami M, Kuriyama H, Kishida K, Nishizawa H, Hotta K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y.** Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 103: 1067-1063, 2001.
77. **Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y.** Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 102: 1296-1301, 2000.
78. **Ouchi N, KS, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K.** Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol* 14: 561-566, 2003.
79. **Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T, Engel J, Brownlee M, Scherer PE.** Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. *J Biol Chem* 278: 9073-9085, 2003.

80. **Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP, Rajala MW, Doebber T, Berger JP, Wagner JA, Wu M, Knopps A, Xiang AH, Utzschneider KM, Kahn SE, Olefsky JM, Buchanan TA, Scherer PE.** Complex distribution, and not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* 279: 12152-12162, 2004.
81. **Pajvani UB, Scherer PE.** Adiponectin: systemic contributor to insulin sensitivity. *Curr Diab Rep* 3: 207-213, 2003.
82. **Pasceri V, Wu H, Willersen J, Yeh E.** Modular of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator activated receptor activators. *Circulation* 101: 235-238, 2001.
83. **Perry C, Petrie JR.** Insulin-sensitising agents: beyond thiazolidinediones. *Expert Opin Emerg Drugs* 7: 165-174, 2002.
84. **Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ, Hess JF.** Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Gen* 13: 18-19, 1996.
85. **Punthakee Z, Delvin E.E, O'Loughlin J, Paradis G, Levy E, Platt R.W, Lambert M.** Adiponectin, Adiposity, and Insulin Resistance in Children and Adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 2119-2125, 2006.
86. **Rasouli N, Yao-Borengasser A, Mile LM, Elbein SC, Kern PA.** Increased plasma adiponectin in response to pioglitazone does not result from increased gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E42-46, 2006.
87. **Saltiel AR.** You are what you secrete. *Nat Med* 7: 887-888, 2001.
88. **Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF.** A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270: 26746-26749, 1995.
89. **Shapiro L, Scherer PE.** The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr Biol* 8: 335-338, 1998.
90. **Spiegelman BM, Flier JS.** Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104: 531-543, 2001.
91. **Spranger J, Kroke A, Möhlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF.** Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 361: 226-228, 2003.
92. **Staiger H, Kaltenbach S, Staiger K, Stefan N, Fritsche A, Guirguis A, Péterfi C, Weisser M, Machicao F, Stumvoll M, Häring HU.** Expression of adiponectin receptor mRNA in human skeletal muscle cells related to in vivo parameters of glucose and lipid metabolism. *2004* 53: 2195-2201, 2004.
93. **Sun X, Han R, Wang Z, Chen Y.** Regulation of adiponectin receptors in hepatocytes by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *Diabetologia* 49: 1303-1310, 2006.
94. **Tan GD, Debard C, Funahashi T, Humphreys SM, Matsuzawa Y, Frayn KN, Karpe F, Vidal H.** Changes in adiponectin receptor expression in muscle and adipose tissue of type 2 diabetic patients during rosiglitazone therapy. *Diabetologia* 48: 1585-1589, 2005.
95. **Tilg H, Moschen AR.** Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6: 772-783, 2006.
96. **Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang CC, Itani SI, Lodish HF, Ruderman NB.** Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: Acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16309-16313, 2002.
97. **Tonelli J, Li W, Kishore P, Pajvani UB, Kwon E, Weaver C, Scherer PE, Kumar S.** Mechanisms of early insulin-sensitizing effects of thiazolidinediones in type 2 diabetes *Diabetes* 53: 1621-1629, 2004.
98. **Trujillo ME, Scherer PE.** Adiponectin – journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J intern med* 257: 167-175, 2005.
99. **Tsao T, Tomas E, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Ruderman NB, Heuser JE, Lodish HF.** Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling

specificity: Different oligomers active different signal pathways. *J Biol Chem* 278: 50810-50817, 2003.

100. **Tsao TS, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Lodish HF.** Oligomerization state-dependent activation of NF- κ B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30). *J Biol Chem* 277: 29359-29362, 2002.

101. **Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, Kamon J, Kobayashi M, Suzuki R, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Froguel P, Nakae J, Kasuga M, Accili D, Tobe K, Ueki K, Nagai R, Kadowaki T.** Insulin/Foxo 1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem* 279: 30817-30822, 2004.

102. **Tsuchida A, Yamauchi T, Takekawa S, Hada Y, Ito Y, Maki T, Kadowaki T.** Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) _{γ} Activation Increases Adiponectin Receptors and Reduces Obesity-Related Inflammation in Adipose Tissue. *Diabetes* 54: 3358-3370, 2005.

103. **Vasseur F, Helbecque N, Dina C, Lobbens S, Delannoy V, Gaget S, Boutin P, Vaxillaire M, Leprêtre F, Dupont S, Hara K, Clément K, Bihain B, Kadowaki T, Froguel P.** Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. *Hum Mol Genet* 11: 2607-2614, 2002.

104. **Vasudevan AR, Balasubramanyam A.** Thiazolidinediones: a review of their mechanism of insulin sensitization, therapeutic potential, clinical efficacy, and tolerability. *Diabetes Technol Ther* 6: 850-863, 2004.

105. **Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, Hara K, Hada Y, Vasseur F, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T.** Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem* 278: 40352-40363, 2003.

106. **Walker A, Dore J, Buckingham RE, Savage MW, Williams G.** Impaired insulin-induced attenuation of noradrenaline-mediated vasoconstriction in insulin-resistant obese Zucker rats. *Clin Sci* 93: 235-241, 1997.

107. **Wang N, Verna L, Chen NG, Chen J, Li H, Forman BM, Stemerman MB.** Constitutive activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ suppresses pro-inflammatory adhesion molecules in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 277: 34176-34181, 2002.

108. **Wang Y, Xu A, Knight C, Xu LY, Cooper GJ.** Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin. Potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity. *J Biol Chem* 277: 19521-19529, 2002.

109. **Winder WW, Hardie DG.** AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *American Journal of Physiology* 277: E1-10, 1999.

110. **Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H.** Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Com* 323: 630-635, 2004.

111. **Xu A, Chan KW, HOO RL, Wang Y, Tan KC, Zhang J, Chen B, Lam MC, Tse C, Cooper GJ, Lam KS.** Testosterone selective reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *J Biol Chem* 280: 18073-18080, 2005.

112. **Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T.** Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423: 762-769, 2003.

113. **Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Fofelle**

- F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T.** Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8: 1288-1295, 2002.
114. **Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T.** The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 7: 941-946, 2001.
115. **Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N, Kubota T, Ito Y, Kamon J, Tsuchida A, Kumagai K, Kozono H, Hada Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Awazawa M, Takamoto I, Froguel P, Hara K, Tobe K, Nagai R, Ueki K, Kadowaki T, Hara K, Yamauchi T, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R.** Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* 13: 332-339, 2007.
116. **Zucker LM, Antoniades HN.** Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rat "fatty". *Endocrinology* 90: 1320-1330, 1972.
117. **Zucker TF, Zucker LM.** Hereditary obesity in the rat associated with high serum fat and cholesterol. *Proc Soc Exp Biol Med* 110: 165-171, 1962.